

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Anna Krejčíříková

Produkce myšího rekombinantního prionového proteinu (mrPrP) a studium jeho vlastností

Katedra biochemie

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Konzultant: dr. Ing. Karel Holada, ÚIM 1. LF UK

Praha 2010

Charles University in Prague

Faculty of Science

DIPLOMA THESIS



Anna Krejčíříková

Production of mouse recombinant prion protein and analysis of its properties

Department of Biochemistry

Supervisor: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Consultant: dr. Ing. Karel Holada, IIM 1stFM CU

Prague 2010

Ráda bych zde poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za podporu a laskavý přístup během celého mého studia. Dále děkuji Dr. Ing. Karlu Holadovi a Mgr. Evě Dvořákové za odborné rady a pomoc při mém projektu.

Děkuji též ostatním spolupracovníkům z Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. LF UK za přátelské pracovní prostředí a cenné diskuse.

Poděkování patří též mým rodičům a především mému manželovi, který mi byl a stále je velkou oporou.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci napsala samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 23.4.2010

Anna Krejčířková

Obsah

Abstrakt	6
1 Úvod	8
1.1 Prionová onemocnění	8
1.2 Infekční agens	9
1.3 Prionová hypotéza	10
1.4 Důkaz prionové hypotézy	11
2 Teoretická část	13
2.1 Prionový protein	13
2.1.1 Struktura buněčného a patologického prionového proteinu . . .	13
2.1.2 Fyziologické a patogenní funkce prionového proteinu	16
2.1.3 Paralogy prionového proteinu	17
2.2 Konverze prionového proteinu	17
2.2.1 Molekulární mechanismus konverze prionového proteinu	18
2.2.2 Faktory konverze prionového proteinu	18
2.3 Výzkum prionových onemocnění	21
2.3.1 Rekombinantní prionový protein	21
2.3.2 Konverze prionového proteinu <i>in vitro</i>	22
2.3.3 Studium faktorů konverze prionového proteinu	26
2.3.4 Posttranslační neenzymatické modifikace prionového proteinu .	28

3	Cíl práce	31
4	Experimentální část	32
4.1	Materiál a přístroje	32
4.1.1	Použité chemikálie	32
4.1.2	Laboratorní přístroje	34
4.1.3	Ostatní použitý materiál	35
4.1.4	Bakteriální buňky, plazmidy, protilátky a afinitní matrice	35
4.2	Metody	36
4.2.1	Konstrukce plazmidu pET-15b obsahující gen pro myší rekombi- nantní prionový protein (mrPrP)	36
4.2.2	Horizontální agarosová elektroforéza	38
4.2.3	Transformace	39
4.2.4	Minipreparace plazmidové DNA ("miniprep")	39
4.2.5	Exprese mrPrP v bakteriích <i>E.coli</i>	40
4.2.6	Příprava močovinového extraktu mrPrP	41
4.2.7	Afinitní chromatografie na Ni-NTA matrici	42
4.2.8	Oxidace a renaturace mrPrP	43
4.2.9	Enzymatické odštěpení 6xHis-kotvy	43
4.2.10	Afinitní chromatografie na benzamidinové matrici	43
4.2.11	Neenzymatická modifikace mrPrP	44
4.2.12	Štěpení mrPrP pomocí proteinasy K	44
4.2.13	SDS-PAGE (elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu)	45
4.2.14	Western blot (elektroforetický přenos proteinů na membránu s imunochemickou detekcí)	46
4.2.15	Spektrální analýza	47

5	Výsledky	49
5.1	Konstrukce plazmidu pET-15b obsahující gen pro myší rekombinantní prionový protein (mrPrP)	49
5.2	Příprava myšího rekombinantního prionového proteinu (mrPrP)	51
5.2.1	Exprese mrPrP v bakteriích <i>E.coli</i>	52
5.2.2	Příprava močovinového extraktu mrPrP	52
5.2.3	Afinitní chromatografie na Ni-NTA matrici	53
5.2.4	Oxidace a renaturace mrPrP	55
5.2.5	Enzymatické odštěpení 6xHis-kotvy	56
5.2.6	Afinitní chromatografie na benzamidinové matrici	58
5.3	Spektrální analýza myšího rekombinantního proteinu (mrPrP)	60
5.3.1	Stanovení koncentrace proteinů proměřením UV spektra	60
5.3.2	CD spektroskopie	62
5.4	Neenzymatická modifikace myšího rekombinantního proteinu (mrPrP) .	63
5.4.1	Neenzymatická modifikace mrPrP kyselinou glyoxalovou	63
5.4.2	Štěpení mrPrP pomocí proteinasy K	65
6	Diskuse	67
7	Závěr	71
	Literatura	72
	Seznam zkratek	79

Název práce: Produkce myšího rekombinantního prionového proteinu (mrPrP) a studium jeho vlastností

Autor: Anna Krejčířiková

Katedra (ústav): Katedra biochemie

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

E-mail vedoucího: konval@uochb.cas.cz

Konzultant: dr. Ing. Karel Holada, ÚIM 1. LF UK

Abstrakt:

Prionová onemocnění sice představují jen malou část ze všech známých neurodegenerativních nemocí, přesto si zaslouží naši pozornost vzhledem k faktu, že se jedná o smrtelné a dosud nevyléčitelné choroby mající i potenciál způsobit vznik epidemie. Přestože se vědci tímto tématem zabývají již mnoho let, existuje stále řada nezodpovězených otázek o mechanismu vzniku a šíření prionových onemocnění. V současnosti nejslibnější teorií, jenž vysvětluje podstatu nemoci konverzí buněčného prionového proteinu (PrP^C) v patologický prionový protein (PrP^{Sc}), je "protein-only" hypotéza. Důležitým nástrojem při dokazování této hypotézy je mimo jiné i rekombinantní prionový protein. Předkládaná diplomová práce shrnuje dosavadní úspěchy v ověřování prionové hypotézy. V experimentální části se zabýváme přípravou myšího rekombinantního prionového proteinu (mrPrP) v bakteriích *E. coli*. Strukturu purifikovaného a renaturovaného proteinu jsme ověřovali pomocí CD spektroskopie. V další fázi našeho výzkumu jsme se zaměřili na studium vlivu posttranslační neenzymatické modifikace, konkrétně glykace, na stabilitu proteinu.

Klíčová slova: PrP^C , PrP^{Sc} , "protein-only" hypotéza, mrPrP, CD spektroskopie, posttranslační neenzymatická modifikace, glykace

Title: Production of mouse recombinant prion protein and analysis of its properties

Author: Anna Krejčířková

Department: Department of Biochemistry

Supervisor: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.,

Supervisor's e-mail: konval@uochb.cas.cz

Consultant: dr. Ing. Karel Holada, IIM 1stFM CU

Abstract:

Although prion diseases represent only a small fraction of all known neurodegenerative illnesses, they deserve our attention mainly due to the fact that they are lethal, incurable by today, and having a potential to cause a serious epidemic. Even though this topic has been studied for many years, there are still many unanswered questions concerning both the mechanism, and the spread of prion diseases. The most promising current theory is the protein-only hypothesis, which explains the fundamental of the illness by the conversion of cellular prion protein (PrP^C) into pathological prion protein (PrP^{Sc}). The important tool in proving this theory is also a recombinant prion protein. The presented thesis summarizes existing successes in the proving of protein-only hypothesis. In the experimental part, we prepared the mouse recombinant prion protein (mrPrP) in *E. coli* bacteria. The structure of the purified and renatured protein was verified by CD spectroscopy. Next, we focus on the effects of the posttranslational nonenzymatic modification of mrPrP by glycation on the stability of the protein.

Keywords: PrP^C , PrP^{Sc} , protein-only hypothesis, mrPrP, CD spectroscopy, posttranslational nonenzymatic modification, glycation

Kapitola 1

Úvod

1.1 Prionová onemocnění

Prionová onemocnění, také označovaná jako transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE), patří do rozsáhlé skupiny neurodegenerativních chorob, které postihují lidi i ostatní zvířata. Tato vzácná smrtelná onemocnění se vyznačují charakteristickými klinickými a patologickými příznaky, např. dlouhou inkubační dobou, chybějící imunitní odpovědí organismu a typickými neuropatologickými znaky jakými jsou odumírání neuronů, tvorba amyloidních plaků a spongiformní vzhled mozkové tkáně.

Lidská prionová onemocnění se v největším počtu případů objevují jako sporadická bez zjevné příčiny. Dále mohou být způsobena geneticky a velmi ojediněle i infekčním přenosem. Právě tato poslední možnost vzniku nemoci značně odlišuje TSE od ostatních chorob, jež jsou spojovány s akumulací konformačně pozměněných forem proteinů (amyloidů), např. cystickou fibrózou, hemolytickou anémií, diabetem typu II, amyotropickou laterální sklerózou nebo Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou.

Důležitým poznatkem studia TSE je fakt, že tato onemocnění jsou přenosná, ale nejsou nakažlivá. K přenosu může dojít během lékařských zákroků při použití kontaminovaných nástrojů nebo biologického materiálu od infikovaného dárce. Nejznámějším in-

fekčně šířeným prionovým onemocněním se stalo kuru, jež způsobilo v 50. letech epidemií mezi domorodými kmeny žijícími na ostrově Nová Guinea. Za prokázání infekčního původu kuru obdržel v roce 1976 americký lékař Daniel Carleton Gajdusek Nobelovu cenu. Avšak nejstarší popsanou TSE je ovčí nebo kozí klusavka zvaná "scrapie". Tato choroba je známa už bezmála 300 let a nikdy nedošlo k jejímu přenosu na člověka. Panoval tedy obecný předpoklad existence mezidruhovú bariéry, která zabraňuje přenosu choroby mezi jednotlivými druhy. Tento předpoklad ale padl s nástupem epidemie nemoci šílených krav (BSE), jež dokázala překonat bariéru a přenést se infikovaným masem i na člověka v podobě variantní Creutzfeld-Jakobovy choroby (vCJD).

1.2 Infekční agens

Po těchto prvních objevech se další výzkum prionových onemocnění soustředil na hledání infekčního agens, jenž by bylo zodpovědné za vznik těchto chorob (znázorněno na obr. 1.1, str. 10). Jedna z teorií předpokládá, že původcem onemocnění je pomalý virus s neobvykle dlouhou inkubační dobou mezi expozicí infekčním agens a objevením symptomů [1]. S dalšími objevy na tomto poli se rozšířil i názor, že původ infekčního agens je značně odlišný, ve srovnání s bakteriemi nebo viry, a to jak příliš malou velikostí, tak i rezistencí vůči ultrafialovému a ionizačnímu záření nebo běžným sterilizačním postupům [2]. Pokusy o nalezení viru jako původce TSE nebyly dosud úspěšné. Tyto a i další výsledky vedly ke změně teorie z virové na virionovou teorii. Tato teorie definuje virion jako malou informační molekulu (jako nukleová kyselina) asociovanou s hostitelským proteinem tvořícím obal této částice [3, 4]. Tento názor však neměl velkou podporu vědců, a tak se další výzkum prionových onemocnění začal přiklánět k jiné alternativě, prionové hypotéze.



Obrázek 1.1: Schématické znázornění viru, virionu a prionového proteinu jako možných infekčních agens prionových onemocnění (v pořadí zleva doprava), převzato z [5]

1.3 Prionová hypotéza

Prionová hypotéza (tzv. "protein-only" hypotéza) byla poprvé navržena J.S.Griffithem v roce 1967 a její základní předpoklad je, že původ onemocnění tkví pouze v proteinu [6]. Od 80. let je tato teorie podporována především Stanleyem Prusinerem, který navrhl i současné označení proteinu prion jako zkratku z anglických slov "proteinaceous and infectious" a jenž za objev tohoto proteinu jako původce TSE obdržel v roce 1998 Nobelovu cenu [7].

Podle prionové hypotézy je vznik TSE spojen pouze s přeměnou normálního, organismu vlastního buněčného prionového proteinu PrP^C v patologický protein PrP^{Sc} . Během tohoto posttranslačního děje dochází ke změně v zastoupení sekundárních struktur, konkrétně narůstá množství struktury skládaného listu v molekule proteinu PrP^{Sc} , jenž se tím stává rezistentním vůči proteolýze, nerozpustným v neionogenních detergentech a schopným tvořit agregáty [8]. (názvosloví jednotlivých forem prionového proteinu shrnuto v tab. 1.1, str. 11)

Pochopitelně existují i pochybnosti o pravdivosti prionové hypotézy [9]. Především není stále objasněna existence množství prionových kmenů ("strains"), které se od sebe odlišují inkubační dobou, klinickými příznaky, délkou trvání choroby a lokalizací agregátů PrP^{Sc} v mozku, ale také fyzikálně chemickými charakteristikami proteinu

[10]. Jednou z odpovědí na tyto otázky je podle prionové hypotézy neobvyklá schopnost PrP^{Sc} zaujímat řadu stabilních konformací, jež mohou přeměňovat další molekuly PrP^{C} v infekční protein. Dalším vysvětlením může být existence dosud nepopsaného proteinu, jež napomáhá přeměně PrP^{C} v PrP^{Sc} , nazvaného prozatím faktor X [10].

K vyřešení těchto otázek směřuje rozsáhlý výzkum, jehož výsledky by měly definitivně prokázat prionovou hypotézu.

Tabulka 1.1: Názvosloví jednotlivých forem prionového proteinu, upraveno podle [5]

PrP	obecné označení prionového proteinu
PrP^{C}	buněčný prionový protein
PrP^{Sc}	patologický "scrapie" prionový protein
PrP-res	prionový protein částečně rezistentní vůči proteolýze
PrP27-30	rezistentní fragment prionového proteinu po štěpení proteinasou K

1.4 Důkaz prionové hypotézy

Je zřejmé, že definitivní důkaz prionové hypotézy spočívá v přípravě plně infekčního PrP^{Sc} *in vitro* [11]. Pokud je totiž tento patologický protein oním infekčním agens a replikace tohoto proteinu závisí na interakci s PrP^{C} , měl by být celý tento proces reprodukovatelný i v laboratorních podmínkách, což je cílem mnoha výzkumných týmů [5].

Jedním z přístupů, jež by mohly napomoci prokázání prionové hypotézy, je přeměna rekombinantního prionového proteinu v protein vykazující strukturu skládaného listu a biochemické a biologické vlastnosti PrP^{Sc} [5]. V současnosti se řada laboratoří soustřeďuje na pokusy o vyvolání infekce takto připraveným proteinem u laboratorních zvířat, a to jak u standardních ("wild-type") myší, tak i u transgenních myší, u kterých ale zjevně existuje mnoho pochyb ohledně správnosti výsledků, a to zejména u myší expri-

mujících PrP^C ve zvýšené míře. V nedávné době byly publikovány výsledky několika úspěšných pokusů na "wild-type" myších, které byly infikovány myším rekombinantním proteinem, pozměněným různými metodami v PrP-res (tab. 1.1, str. 11) a se schopností u těchto experimentálních zvířat vyvolat prionové onemocnění (viz. kap. 2.3.3).

Klíčem k úspěchu těchto pokusů byl a je myší rekombinantní protein, jeho úspěšná exprese v různých systémech (především v bakteriích *E. coli*), purifikace a renaturace ve správně sbalený rozpustný protein. Stejně tak je podstatným problémem při ověřování prionové hypotézy otázka přítomnosti dalších faktorů ovlivňujících konverzi prionového proteinu a schopnost infekivity takto přeměněného proteinu. Je velmi důležité brát v úvahu možné posttranslační modifikace prionového proteinu, a to jak kovalentní změny v primární struktuře proteinu, tak i nekovalentní, ovlivňující sekundární a terciární strukturu proteinu. Těmito důležitými aspekty definitivního důkazu prionové hypotézy se zabývá i tato diplomová práce.

Kapitola 2

Teoretická část

2.1 Prionový protein

Důležitými kroky v pochopení rozdílů mezi buněčným (PrP^C) a patologickým (PrP^{Sc}) prionovým proteinem a jejich fyziologickými a patogenními funkcemi, a konečně i k pochopení celého mechanismu konverze prionového proteinu byly především strukturní analýzy obou isoform proteinu, studium jejich vazebných partnerů a obecně faktorů procesu konverze prionového proteinu, jakož i identifikace paralogů tohoto proteinu.

2.1.1 Struktura buněčného a patologického prionového proteinu

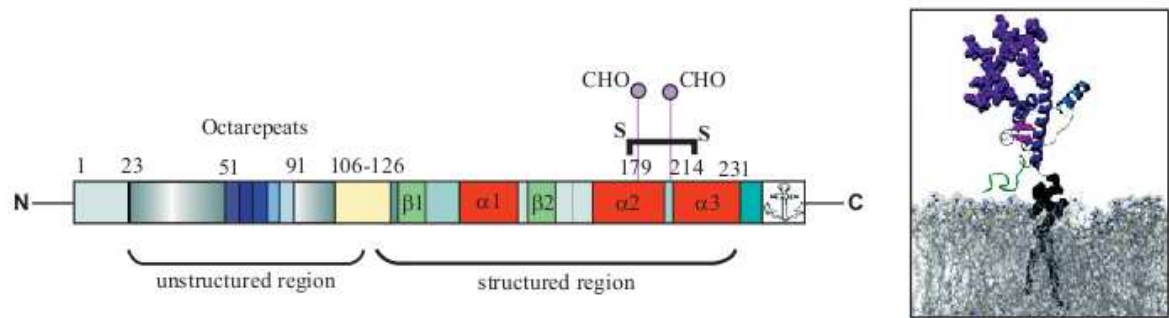
Buněčný prionový protein (PrP^C) je membránově vázaný monomerní protein o délce 209 aminokyselin a je exprimován buňkami jako produkt jediného genu zvaného *Prpn* lokalizovaného na krátkém raménku chromozómu 20 (lidský buněčný prionový protein). Vysoce konzervovaná primární struktura PrP^C naznačuje obecnou a důležitou roli tohoto proteinu v organismu, avšak konkrétní fyziologické funkce nejsou dosud přesně známy. Na N-konci prionového proteinu se nachází signální sekvence, která je odštěpena během maturace proteinu v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu. Na C-konec

je připojena glykosylfosfatidylinositolová (GPI) kotva. Glykosylovaná oblast proteinu se nachází blízko C-konce a obsahuje dvě glykosylační místa, Asn-181 a Asn-107. Protein tedy existuje jak v neglykosylované formě, tak v mono- a diglykosylované podobě [12].

U prionového proteinu rozeznáváme dlouhou a flexibilní neuspořádanou oblast N-koncových aminokyselin v rozmezí 23-121, obsahující pět opakujících se oblastí bohatých na glycín a prolin ("octarepeats") schopných vázat bivalentní ionty, např. Cu^{2+} , centrální hydrofobní doménu mezi aminokyselinami 106-126 a globulární C-terminální oblast aminokyselin 128-231. Globulární doména obsahuje dvě krátké části tvořící antiparalelní skládané listy a tři α -helikální části. Během posttranslačních úprav dochází k odštěpení signální sekvence, ke stabilizaci proteinu díky disulfidické vazbě mezi aminokyselinami Cys-179 a Cys-214, k připojení oligosacharidů na N-koncové části aminokyselin 180 a 196 a napojení glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvy na C-koncovou aminokyselinu 231 [12]. (schéma proteinu znázorněno na obr. 2.1, str. 15)

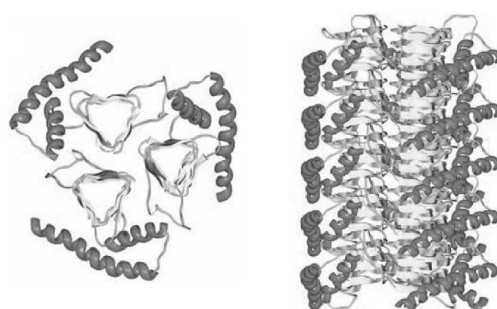
Pomocí metod nukleární magnetické resonance a proteinové krystalografie byla vyřešena struktura PrP^C a spolu s dalšími biochemickými studiemi nastínila přítomnost α -helikální struktury a s tím spojenou vysokou citlivost vůči proteolýze [13, 14]. Naopak u patologického prionového proteinu (PrP^{Sc}) tyto metody selhávají kvůli problémům s purifikací a rozpustností proteinu a neposkytují detailní obraz o struktuře. Proto se výzkum přesouvá k jiným, daleko méně přesným technikám jako jsou cirkulární dichroismus, infračervená spektroskopie, počítačové modelování a další metody [12].

Díky těmto metodám rozpoznáváme u PrP^{Sc} strukturu skládaných listů stabilizovanou vodíkovými můstky a ostatními typy nekovalentních interakcí. Analýza krátkých oligopeptidových řetězců představujících části prionového proteinu ukazuje, že k vytvoření fibrilů postačují úseky čtyř až sedmi aminokyselin. Na základě výsledků kryoelektronové mikroskopie a homologního modelování se dospělo k názoru, že PrP^{Sc} obsahuje skládané listy v oblasti aminokyselin 81-95 až 171, zatímco C-terminální struktura zůstává nezměněna. Skládané listy se dále formují v levotočivé β -helixy. Předpokládá se, že tři molekuly patologického prionového proteinu asociují v jednotku, jež je poté



Obrázek 2.1: Schéma (vlevo) a struktura (vpravo) buněčného prionového proteinu (PrP^C) včetně N-koncové signální sekvence a glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvy, převzato z [15]

základem pro tvorbu fibril [16]. Vytvoření struktur skládaných listů vede k již zmíněné nerozpustnosti proteinu a vzniku částečné rezistence vůči enzymatické degradaci. Pokud je tedy PrP^{Sc} vystaven působení proteolytických enzymů, např. proteinasy K, dochází k odštěpení N-terminální části proteinu až k rozmezí aminokyselin 81-95. Tato částečná rezistence PrP^{Sc} vůči proteolýze způsobuje snížení rozpustnosti proteinu v neiontových rozpouštědlech, tvorbu agregátů a prodloužení buněčného poločasu, což vede k akumulaci patologického prionového proteinu v buňkách a k vytváření amyloidních plaků v extracelulárním prostoru. Vizualizace PrP^{Sc} je možná díky specifickému barvení (např. Congo Red, thioflavin T). Fibrily proteinu se hromadí i mimo buňky a také v lysosomálních a endosomálních kompartmentech. Agregáty PrP^{Sc} slouží jako templát pro přeměnu dalších molekul buněčného prionového proteinu (PrP^C). Autokatalytická aktivita agregátů závisí na jejich velikosti. Částice o počtu 14-28 molekul vykazují největší potenciál infekivity a míry konverze proteinu [12]. (struktura patologického prionového proteinu znázorněna na obr. 2.2, str. 16)



Obrázek 2.2: Modelová struktura patologického prionového proteinu PrP^{Sc} : formování skládaných listů v levotočivé β -helixy v molekule PrP^{Sc} (vlevo), vytvoření fibrilární struktury ze tří molekul PrP^{Sc} (vpravo), převzato z [16]

2.1.2 Fyziologické a patogenní funkce prionového proteinu

Evolučně zakonzervovaná primární struktura prionového proteinu podporuje názor o velmi důležité roli PrP^{C} v různých biologických procesech [5]. Nicméně fyziologická úloha tohoto proteinu není dosud plně popsána a prozatím není ani jisté, jak samotná dysfunkce PrP^{C} po přeměně v PrP^{Sc} ovlivňuje průběh vzniku patogenních projevů v organismu, např. buněčný stres, následnou smrt buněk a neurodegeneraci [17]. Některé studie podporují tvrzení, že abnormální prionový protein je toxický vůči nervovým buňkám, a to jak přímo, tak i nepřímo přes gliové buňky aktivací signálních drah a poté apoptotickým zánikem [17].

Pokusy na myších neexprimujících buněčný prionový protein neprokázaly dosud jasnou funkci tohoto proteinu, stejně jako nebyly pozorovány signifikantní změny v chování nebo ve fyziologii. Avšak studie na jiných modelech dávají určitou naději při hledání možných rolí buněčného prionového proteinu v organismu [17].

K možným funkcím buněčného prionového proteinu patří role v lymfocytární aktivaci, synaptické plasticitě, neuroprotektci, signální transdukci, v metabolismu mědi a také v diferenciaci a neurogenezi nervových kmenových buněk a při obnově hematopoetických kmenových buněk [17].

2.1.3 Paralogy prionového proteinu

Během pokusů na myších s deletovaným *Prpn* genem byly objeveny dva paralogy prionového proteinu (PrP).

Jako první byl identifikován tzv. "doppel" protein (Dpl). Tento protein se vyskytuje v CNS během embryogeneze a v počátcích života po narození, v dospělosti je tento protein exprimován ve vysoké míře především ve varlatech, kde hraje důležitou roli při spermatogenezi. Jeho struktura sestává ze 179 aminokyselinových zbytků kódovaných *Prnd* genem. Homologie ke struktuře PrP je zřejmá především v oblasti C-konce, naopak Dpl postrádá opakující se úseky osmi aminokyselin ("octarepeats") a hydrofobní doménu na N-konci proteinu. V případě posttranslačních úprav (glykosylace, GPI-kotva, disulfidický můstek) se tyto dva proteiny shodují [18, 19].

Druhým paralogem PrP je tzv. "shadoo" protein (Sho), jenž ve své struktuře obsahuje 145 aminokyselin a je kódován genem označeným jako *Srpn*. Sdílí některé strukturální podobnosti s PrP jako např. glykosylovaný charakter molekuly, GPI-kotvu nebo hydrofobní sekvenci aminokyselinových zbytků. Také se stejně jako PrP exprimuje především v mozkové tkáni, která je hlavním cílem prionové infekce. Tímto se liší od Dpl, který se za normálních podmínek v mozku neexprimuje [20, 21, 22].

Právě s ohledem na rozdílnou expresi těchto dvou paralogů nelze zatím přesně říct, který z nich napomáhá spolu s PrP vzniku infekce a jaké jsou jejich skutečné role v organismu.

2.2 Konverze prionového proteinu

Na základě mnohých pokusů se předpokládá, že podstatou prionové hypotézy je právě konverze buněčného prionového proteinu (PrP^C) v patologický prionový protein (PrP^{Sc}).

2.2.1 Molekulární mechanismus konverze prionového proteinu

Přesný molekulární mechanismus této reakce není dosud znám, avšak na základě dosavadních poznatků byly navrženy dva modely mechanismu konverze (znázorněno na obr. 2.3, str. 19):

- **Matricový model**

Tento model předpokládá, že molekula patologického prionového proteinu slouží jako templát pro konverzi PrP^C v PrP^{Sc} , jenž se dále skládá do amyloidů, které, na rozdíl od samostatných molekul PrP^{Sc} , nemají na šíření infekce žádný vliv. Samovolná přeměna PrP^C v PrP^{Sc} není z důvodu energetické bariéry možná [23].

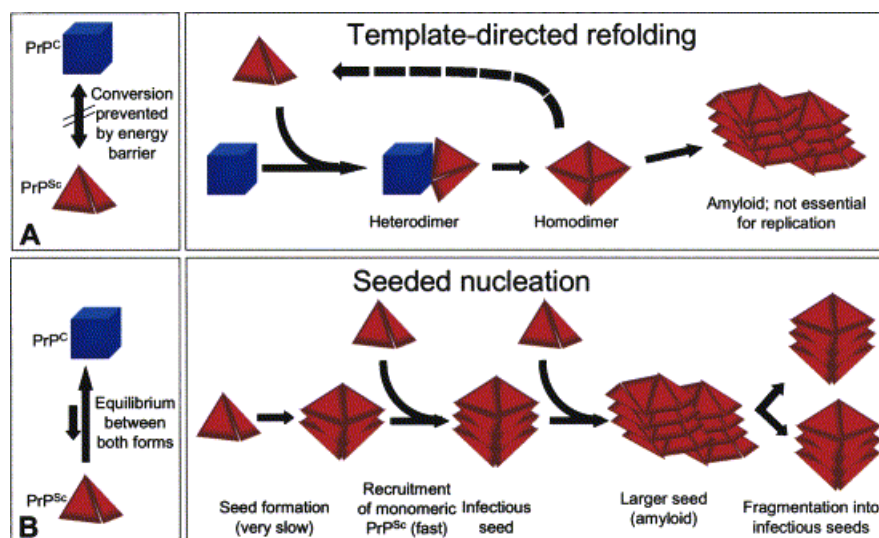
- **Nukleačně polymerační model**

Termodynamická rovnováha mezi PrP^C a PrP^{Sc} je předpokladem druhého uvedeného modelu konverze. Tato rovnováha je ale výrazně posunuta směrem k PrP^C . Díky tomu je samovolná přeměna PrP^C v PrP^{Sc} téměř vyloučena. Pomalým formováním oligomerů patologického prionového proteinu vznikají infekční jádra a rychlost těchto reakcí závisí na koncentraci PrP^{Sc} a velikosti jader. Po vzniku prvního infekčního jádra se rychlost reakcí zvyšuje a vznikají větší agregáty PrP^{Sc} , následně se štěpí na nové jádra a přeměňují další molekuly PrP^C , dokud nenastane termodynamická rovnováha [24].

Žádný z těchto modelů nebyl dosud potvrzen. Chybí důkazy podpořené experimentálními výsledky a dosud přesně neobjasněnou strukturou PrP^{Sc} .

2.2.2 Faktory konverze prionového proteinu

Dle matricového modelu konverze byl přijat názor, že PrP^{Sc} napadá a přeměňuje PrP^C a díky tomu se formují další molekuly patologického proteinu. Mnohé výsledky naznačují, že tohoto, dosud plně neobjasněného procesu, se účastní jeden nebo více dalších faktorů, jež mohou ovlivňovat průběh konverzní reakce [10, 17].



Obrázek 2.3: Dva modely konverze buněčného prionového proteinu (PrP^C) v patologický prionový protein (PrP^{Sc}), A: matricový model, B: nukleačně polymerační model, převzato z [25]

Po pokusech na transgenních myších exprimujících lidský a chimérní myší-lidský prionový protein byl vysloven předpoklad o existenci hypotetického makromolekulárního faktoru, prozatím nazvaného protein X. Ten by se měl vázat na PrP^C , vytvořit s ním binární komplex a tím ovlivňovat jeho konverzi v PrP^{Sc} . Původ a vlastnosti tohoto proteinu nejsou dosud známy [26].

Ačkoli zatím nebyl objeven žádný konkrétní faktor, který by se prokazatelně účastnil procesu konverze PrP^C v PrP^{Sc} , existuje řada známých vazebných partnerů prionového proteinu a jejich počet se neustále zvyšuje (shrnutí v tab. 2.1, str. 20). Tyto proteiny mohou být důležité při studiu dalších funkcí prionového proteinu v organismu [17].

Další skupinu potenciálních faktorů konverze prionového proteinu tvoří nebílkovinné komponenty, jež se přímo podílejí na stabilizaci molekuly PrP^{Sc} a jsou její nedílnou součástí. K této skupině jsou řazeny především polysacharidy, které mohou napomáhat ke stabilitě molekuly PrP^{Sc} a její částečné rezistenci vůči proteolýze. Dalšími možnými faktory této skupiny jsou také sfingolipidy a cholesterol, avšak toto zjištění není nijak

překvapující vzhledem k membránové lokalizaci prionového proteinu. Nukleové kyseliny, a obecně i nejspíše jakékoliv jiné polyaniontové struktury, se mohou účastnit konverzní reakce a to tak, že se specificky naváží na N-konec molekuly prionového proteinu, a tím pozmění jeho strukturu a tudíž i biochemické vlastnosti [27].

Tabulka 2.1: Vazební partneři prionového proteinu, upraveno podle [17]

protein ^a	buněčná lokalizace
GFAP	cytosol
heparin sulfát	extracelulární matrix
Bcl-2	membrány endoplazmatického retikula a mitochondrií
Hsp60	mitochondriální matrix, cytosol
LRP/LR	plazmatická membrána
p66/STI1	cytosol, jádro, plazmatická membrána
Nrf2, APLP1	jádro, neznámá
dystroglykanový komplex	plazmatická membrána, endosomálně/lysosomální systém
kaveolin-1, Fyn	plazmatická membrána (lipidové rafty), cytoplazma
PLG	extracelulární matrix, lipidové rafty
laminin	extracelulární matrix
NCAM	plazmatická membrána
synapsin 1b, Grb2, Pint1	synaptické vezikuly, cytosol, neznámá
PLG & tPA	extracelulární matrix, lipidové rafty
PLG & plazmin	extracelulární matrix, lipidové rafty
angiostatin & PLG	extracelulární matrix, lipidové rafty
NRAGE	cytosol
tubulin	cytosol
proteinový komplex ^b	cytosol

^a GFAP ("glial fibrillary acidic protein"), LRP/LR ("laminin receptor precursor/laminin receptor"), STI1 ("stress-inducible protein 1"), Nrf2 ("NF-E2-related factor 2"), APLP1 ("amyloid precursor-like protein 1"), PLG (plazminogen), NCAM ("neutral cell adhesion molecule"), Pint1 ("prion protein inductor 1"), tPA ("tissue type plasminogen activator"), NRAGE ("neurotrophin receptor interacting MAGE homolog")

^b Složení proteinového komplexu : ribosomální protein P0, β -aktin, CNPasa, kreatinkinasa B, NSE ("neuron-specific enolase"), klathrin (těžký řetězec), α -spektrin, Na^+/K^+ ATPasa $\alpha 3$ podjednotka, GFAP, PLP ("proteolipid protein"), STXBP1 ("syntaxin-binding protein"), ζ -14-3-3, BASP1 ("brain abundant signal protein 1")

2.3 Výzkum prionových onemocnění

Zásadním a dosud plně nepochopeným jevem při přenosu a patogenezí transmisivních spongiformních chorob zůstává mechanismus konverze PrP^C v PrP^{Sc} . Jako největší naděje při objasňování tohoto mechanismu a tedy i při definitivním potvrzení prionové hypotézy se jeví především vývoj *in vitro* bezbuněčných metod co nejdokonaleji napodobujících propagaci prionů *in vivo*. Stěžejním bodem těchto metod je příprava plně infekčního agens z purifikovaného PrP^C nebo ještě lépe z rekombinantního buněčného prionového proteinu, připraveného ve velkém množství a v požadované kvalitě. Dalším důležitým bodem výzkumu prionových onemocnění je studium efektu faktorů konverze prionového proteinu a také vlivu posttranslačních modifikací prionového proteinu.

2.3.1 Rekombinantní prionový protein

Rekombinantní prionový protein, produkováný pomocí různých expresních systémů, a to především pomocí bakteriálních a kvasinkových kultur, ale také prostřednictvím savčích buněk, se stal důležitým nástrojem výzkumu prionových onemocnění.

Konkrétně rekombinantní prionový protein exprimovaný v bakteriích *E.coli* je využíván v mnoha metodách, z nichž nejdůležitější jsou modelování prionové konverze *in vitro*, příprava polyklonálních a monoklonálních protilátek proti různým konformačním variantám prionového proteinu a také studium diagnostiky a terapie prionových chorob. Tyto aplikace vyžadují velmi čistý rekombinantní protein s co nejmenším podílem různých modifikovaných nebo částečně oxidovaných a degradovaných variant tohoto proteinu. Do této doby bylo publikováno množství článků, zabývajících se přípravou, purifikací a renaturací rekombinantního prionového proteinu různých živočišných druhů, o různé délce aminokyselinového řetězce a v některých případech také s připojenými afinitními kotvami [28, 29, 30, 31, 32, 33].

K ověření kvalitativních a kvantitativních charakteristik rekombinantního prionového proteinu se používají metody jako SDS-PAGE, western blot a spektroskopické techniky, např. měření absorpance v UV spektru, CD spektroskopie nebo hmotnostní spektroskopie.

2.3.2 Konverze prionového proteinu *in vitro*

Studium molekulární podstaty konverze prionového proteinu se ve svých počátcích soustředilo na sledování průběhu vzniku a přenosu prionových onemocnění, a to především na buněčných a zvířecích modelech [34, 35]. Během dlouhé doby byly vyvíjeny další metody studia konverze prionového proteinu se zaměřením na *in vitro* eseje, z nichž ale dosud žádná nebyla schopna přesně reprodukovat tuto reakci mezi PrP^C a PrP^{Sc} , vedoucí ke vzniku onemocnění [36].

Během prvních pokusů se vědci zaměřili na přípravu rezistentních variant prionového proteinu (PrP-res) z chimérního nebo radioaktivně značeného prionového proteinu produkovaného eukaryotními buňkami, jenž byl v podobě buněčného lyzátu inkubován s endogenním nebo exogenním PrP^{Sc} . V dalším případě se pokusili připravit PrP-res také z radioaktivně značeného PrP^C , avšak připraveného v bezbuněčném systému, inkubací s mikrosomálními membránami izolovanými z infikovaných mozkových buněk. Bohužel žádný z těchto postupů nevedl k přeměně buněčného prionového proteinu v PrP-res . Přesto tyto experimenty položily základ pro další výzkum metod konverze prionového proteinu *in vitro* [37].

- **”Cell-free” konverzní esej**

Velký skok ve výzkumu prionových onemocnění znamenal vývoj nové metody, ”cell-free” konverzního eseje, díky které se podařilo připravit protein vykazující částečnou rezistenci vůči proteinase K [38]. Základ úspěchu spočíval v PrP^{Sc} , purifikovaném z infikovaných mozkových buněk v přítomnosti 2-3 M guanidinydrochloridu (GdnHCl), který byl v nadbytku přidán k radioaktivně značenému

PrP^C, produkovanému fibroblastovými buňkami. Vzniklé molekuly PrP-res byly podrobeny štěpení pomocí proteinasy K a poté analyzovány na základě jejich radioaktivity. Takto bylo zjištěno, že samotné konverzní reakce se zúčastnilo a bylo tedy přeměněno přibližně 10 až 20 % PrP^C [39, 40, 41]. Tento esej byl dále modifikován, např. použitím KCl nebo NaCl místo GdnHCl. Tato změna prostředí měla lépe napodobovat skutečné fyziologické podmínky konverze, avšak výtěžek reakce za těchto podmínek byl podstatně menší [40, 42, 43, 44, 45]. PrP-res, vzniklý na základě této metody, ale nemohl být plně charakterizován jako produkt reakce kvůli vysokému nadbytku na počátku přidaného PrP^{Sc} a tedy ani identifikován jako infekční agens při případném vyvolání onemocnění [46].

- **”Cell-lysate” konverzní esej**

Další pokrokem ve výzkumu se stala metoda nazvaná ”cell-lysate” konverzní esej. Vědcům se zde podařilo připravit PrP-res, a to na základě inkubace lyzátu chimérického PrP^C, produkovaného buňkami vaječníku, s nadbytkem PrP^{Sc} z infikovaných mozkových buněk. Navzdory stejným problémům s infektivitou proteinu jako v případě předchozí ”cell-free” konverzního eseje vyvstal důležitý problém celého výzkumu prionových onemocnění, a to právě otázka efektu faktorů konverze, jež se mohou vyskytovat právě v buněčném lyzátu a ovlivňovat tak průběh reakce [47].

- **Cyklická amplifikace (PMCA)**

Skutečným průlomem ve výzkumu konverze prionového proteinu *in vitro* byl objev metody cyklické amplifikace. Úspěch této metody spočívá ve využití sonikace, která napomáhá rozbíjet amyloidové struktury a vytvářet tak malé shluky molekul PrP^{Sc}, které potom slouží jako amplifikační jádra pro další přeměnu molekul PrP^C. Konkrétní reakční směs se skládá z infekčního mozkového homogenátu, z velmi vysokého nadbytku buněčného prionového proteinu rovněž ve formě mozkového homogenátu a detergentů, a to jak iontových (SDS), tak

i neiontových (Triton X-100) [48]. Tato metoda umožňuje přípravu libovolného množství PrP-res s ohledem na počet cyklů reakce a díky přístroji, který umožňuje naprogramovat počet cyklů i intervaly sonikačních impulsů, je i relativně pohodlná [49]. Vytvořené molekuly PrP-res zachovávají stejné biochemické vlastnosti jako původní PrP^{Sc} v infekčním mozковém homogenátu a stejně tak jsou schopné vyvolat i onemocnění. Takto vyvolaná prionová choroba se ale vyznačuje delší inkubační dobou, zachovává si však původní schopnost přenosu z jednoho jedince na druhého [50]. I tato metoda podporuje názor o nutné přítomnosti faktorů konverze prionového proteinu. Problémem této metody je především obtížná reprodukovatelnost vzhledem k možným rozdílům mezi jednotlivými kmeny prionového proteinu, nutný je optimalizační proces [51].

- **Cyklická amplifikace v neiontovém prostředí**

Modifikací klasické cyklické amplifikace vznikla další metoda konverze prionového proteinu *in vitro*, jež se zaměřila především na studium už několikrát zmíněných faktorů, jež jsou pravděpodobně nedílnou součástí celé konverzní reakce. Aby mohly být tyto faktory dále zkoumány, bylo nutné omezit vliv sonikace a iontových detergentů (SDS). Pokud byly do reakční směsi přidány pouze purifikované proteiny (PrP^C z mozkového homogenátu a PrP27-30), výtěžek konverze se výrazně snížil v porovnání s předchozí metodou PMCA [52]. Přidáním syntetické RNA k reakční směsi bylo dosaženo opačného výsledku, tedy podstatného zvýšení výtěžku konverzní reakce [53, 54]. Stejného efektu bylo dosaženo i po opětovném zařazení sonikace a i díky důkladnému promíchávání reakční směsi [53]. Dokonce i při odstranění PrP27-30 z reakční směsi (obsahující tedy jen PrP^C a RNA) se během inkubace a třepání vytvořili molekuly PrP-res, které byly schopny vyvolat u experimentálních zvířat prionové onemocnění [54, 55].

- **Rekombinantní cyklická amplifikace**

Další z možných modifikací klasické cyklické amplifikace představuje konverzní

reakce rekombinantního prionového proteinu produkovaného bakteriemi *E.coli* za přítomnosti purifikovaného PrP^{Sc} nebo přímo infekčního mozkového homogenátu. Tato metoda využívá stejný princip produkce PrP-res jako klasická metoda PMCA, tedy sonikační impulsy, v přítomnosti neiontového detergentu Tritonu X-100, jež by měl zabránovat spontánní agregaci rekombinantního prionového proteinu. Právě použití rekombinantního proteinu jako substrátu (místo purifikovaného PrP^C) umožňuje do jisté míry eliminovat vliv faktorů konverzní reakce [56].

- **”Quaking-induced” konverzní esej (QUIC)**

”Quaking-induced” konverzní esej byl vyvinut na základě předchozí metody rekombinantní cyklické amplifikace. Sonikace je v tomto případě nahrazena automatizovaným třepáním v předem daných časových intervalech, jež indukuje konverzi PrP^C v PrP-res v přítomnosti infekčního mozkového homogenátu. Výhody této metody jsou zřejmé, jedná se především o časovou nenáročnost, ale také o jednoduchost, vysokou sensitivitu a snadnou reprodukovatelnost [57].

- **Autokatalytická konverzní esej**

Tento nový *in vitro* esej byl navržen na základě předpokladu o autokatalytické vlastnosti rekombinantního prionového proteinu samovolně se přeměnit v PrP-res i v nepřítomnosti PrP^{Sc}. Rekombinantní prionový protein se v prostředí močoviny nebo guanidinhydrochloridu formuje ve dva různé typy struktur bohatých na skládané listy, a to β -oligomery a fibrily. Vlivem soustavného třepání vznikají fibrily přímo z jednotlivých molekul rekombinantního proteinu nebo i postupně přes β -oligomery. Tvorbu fibril je možné sledovat pomocí fluorescenčního barviva thioflavinu T, které se specificky váže právě na vznikající fibrily rezistentního proteinu. Tato metoda umožňuje provádět konverzní reakci v nepřítomnosti jakýchkoliv faktorů a příměsí díky vyloučení všech buněčných forem jak purifikovaných proteinů, tak ve formě homogenátu [27, 58, 59].

Vývoj všech výše zmíněných metod znamenal důležitý pokrok ve výzkumu prionových onemocnění a poskytl vědcům nástroj k dalšímu studiu, a to především ke studiu efektu faktorů konverze prionového proteinu, jenž se ukázaly být významnou otázkou při dokazování prionové hypotézy.

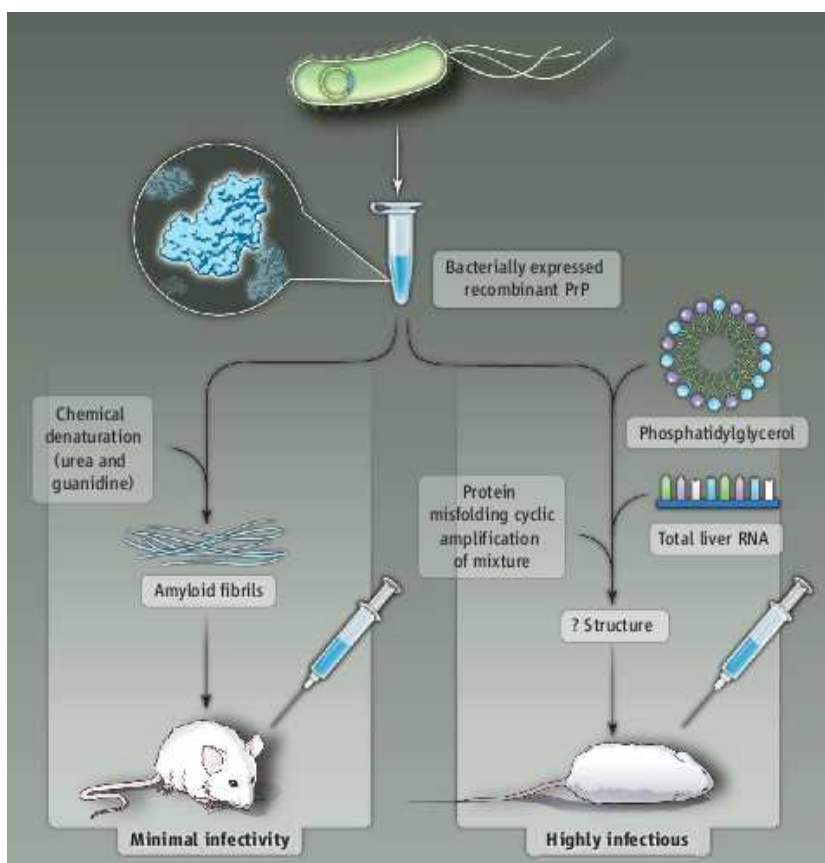
2.3.3 Studium faktorů konverze prionového proteinu

Studiem efektu faktorů na konverzi prionového proteinu se vědci začali zabývat po sérii neúspěšných pokusů o vytvoření plně infekčního PrP-res z rekombinantního prionového proteinu. Pomocí autokatalytické konverzní esejí byly připraveny fibrily a jejich směsi byly inokulovány experimentální zvířata a to jak "wild-type", tak transgenní zvířata exprimující prionový protein ve zvýšené míře. Infekce se projevila u transgenních zvířat, avšak tento výsledek není možné považovat za úplně věrohodný vzhledem k možnosti samovolného vzniku infekce u takto geneticky modifikovaných organismů. Naproti tomu, projevy infekce u "wild-type" jedinců byly minimální [60, 61, 62, 63] (znázorněno na obr. 2.4, str. 27).

Stěžejních výsledků bylo dosaženo pomocí metody cyklické amplifikace (PMCA). Pokus byl proveden se směsí nedenaturovaného rekombinantního prionového proteinu, kompletní purifikované jaterní RNA a syntetických lipidů, konkrétně 1-palmitoyl-2-oleoyl-fosfatidylglycerol (POPG). Takto vznikl PrP-res, který byl schopen ve 100% případech infikovat "wild-type" zvířata, která později na tuto infekci i zemřela. Charakteristickými rysy infekce byla relativně krátká inkubační doba a také schopnost přenosu mezi jedinci stejného druhu [64] (znázorněno na obr. 2.4, str. 27).

Nejnověji byly publikovány výsledky pokusu, při němž se povedlo infikovat "wild-type" jedince pomocí PrP-res, připraveného metodou rekombinantní cyklické amplifikace, z rekombinantního prionového proteinu ve směsi s PrP27-30, izolovaným a purifikovaným z infekčního mozkového homogenátu [65].

Výsledky všech těchto pokusů tedy jednoznačně dokazují důležitou roli faktorů při konverzi prionového proteinu a vytvořené protokoly pro přípravu PrP-res schopných infekce budou nadále sloužit pro studium přesných reakčních mechanismů konverze a charakteristik prostředí, ve kterých tato reakce probíhá.

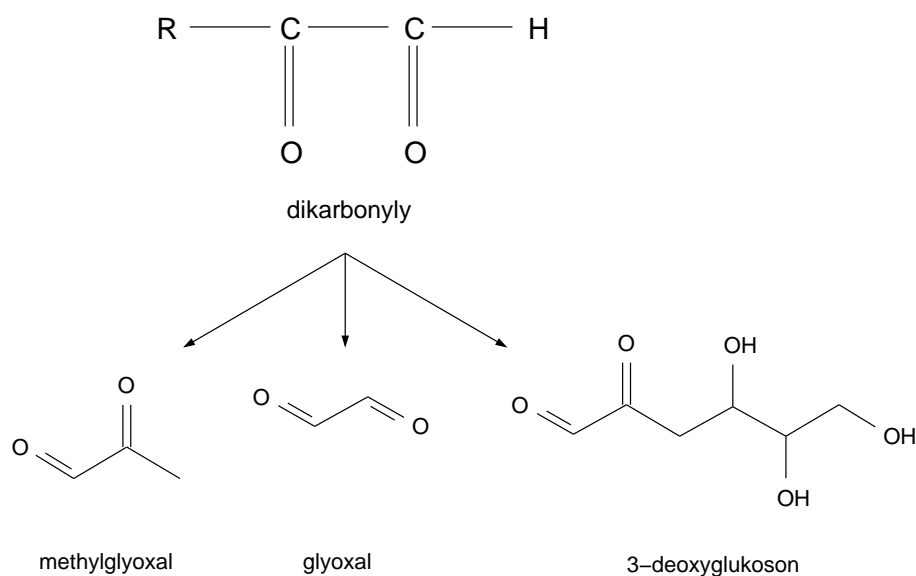


Obrázek 2.4: Schéma popisující dva různé protokoly přípravy PrP-res z rekombinantního prionového proteinu, amyloidní fibrily připravené pomocí autokatalytické konverzní eseye vykazující minimální projevy infekce (vlevo), vysoce infekční prionové částice o neznámé struktuře připravené pomocí metody cyklické amplifikace (PMCA) v přítomnosti kompletní jaterní RNA a syntetických lipidů na bázi fosfatidylglycerolu (vpravo), převzato z [66]

2.3.4 Posttranslační neenzymatické modifikace prionového proteinu

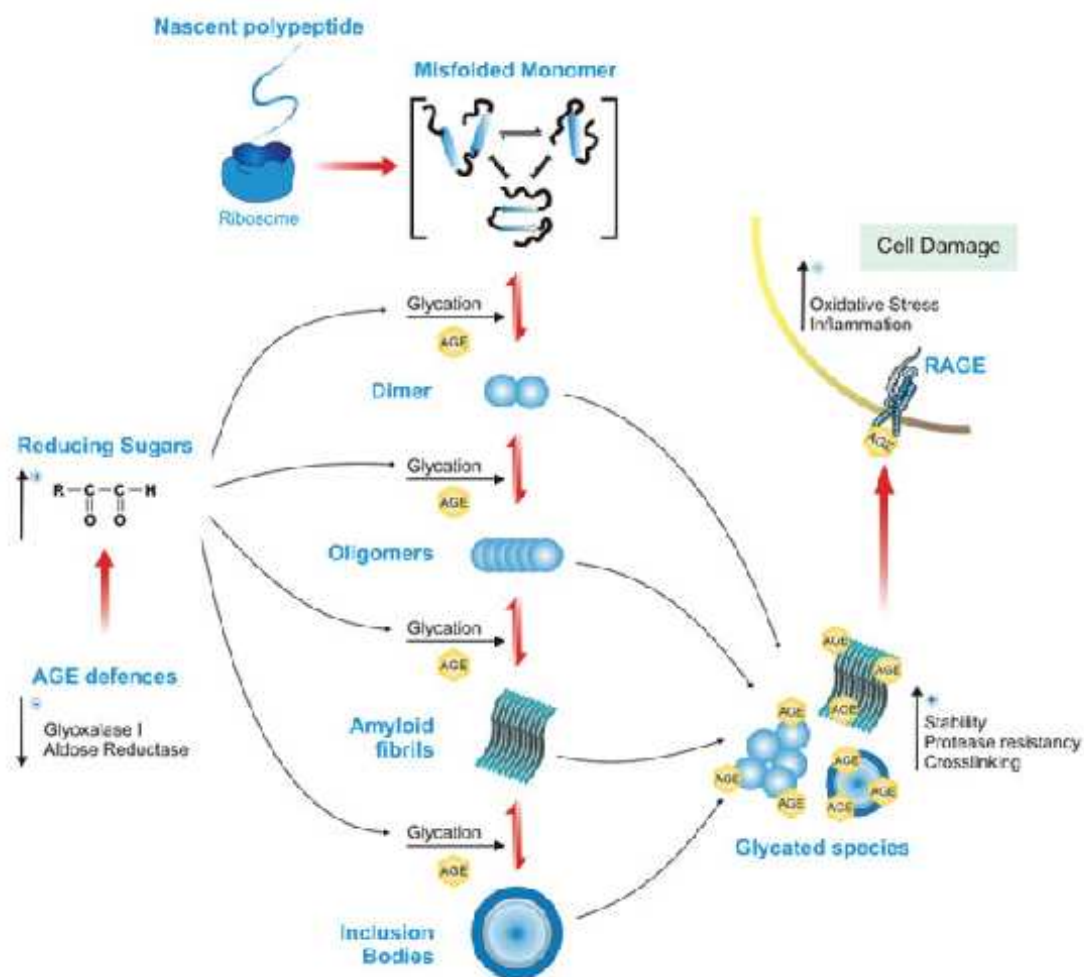
Zajímavým a dosud neprobádaným faktorem ovlivňujícím konverzi prionového proteinu a tím i vznik prionového onemocnění, a to především onemocnění sporadického původu, jsou posttranslační neenzymatické modifikace. Tyto reakce mohou pozměnit strukturu proteinu a také ovlivnit jeho funkci, v krajním případě způsobit i agregaci, následnou akumulaci proteinu a vznik např. Alzheimerovy nebo Parkinsonovy choroby, popř. některých prionových onemocnění [67].

V roce 1912 Louis Camille Maillard navrhl reakční mechanismus glykace, tedy reakce mezi redukujícími cukry (znázorněny na obr.2.5, str. 29) a jejich karbonylovými skupinami a volnými aminoskupinami nejrozličnějších látek vyskytujících se v organismu, převážně tedy proteinů, ale také nukleotidů a některých fosfolipidů [68]. Tento proces dává vznik ireverzibilně modifikovaným molekulám zvaným AGEs, tedy "advanced glycation end products" [69]. V případě proteinů jsou nejčastějšími cíli modifikace právě lysinové a argininové aminokyselinové zbytky, N-koncové amino- a thiolové skupiny. Průběh reakce je ovlivňován jak koncentrací a reaktivitou glykačních činidel [70, 71, 72], přítomností katalyzátorů reakce, hodnotou pH i teplotou [73, 74, 75], ale i samotným typem cílového proteinu [76]. K proteinům, u nichž byla prokázána glykace a jež jsou spojovány se vznikem neurodegenerativních chorob, patří např. amyloid β , tau protein a také samozřejmě prionový protein. Vliv glykace je nejčastěji spojován se vznikem stabilních aduktů, které se dále spojují a vytvářejí tak fibrilární struktury typické právě pro neurodegenerativní choroby. Přesný průběh tohoto procesu ale není dosud plně objasněn, existují pouze domněnky, stejně jako při objasňování konkrétní role glykace v patologii výše zmíněných onemocnění. Takto modifikované molekuly, tedy AGEs, se mohou vázat na své specifické receptory zvané RAGE a jejich prostřednictvím vyvolat oxidativní stres a vznik zánětu v buňkách aktivací signální dráhy NF- κ B [67, 77]. (schéma popsanych procesů znázorněno na obr. 2.6, str. 30)



Obrázek 2.5: Chemické vzorce dikarbonylů, konkrétně methylglyoxalu, glyoxalu a 3-deoxyglukosonu jako nejběžnějších glykačních činidel, upraveno podle [67]

Jak už bylo řečeno výše, i prionový protein podléhá glykačním procesům a v takovéto podobě, spolu se specifickými receptory RAGE, byl i izolován z mozků pacientů trpících Creutzfeldovou-Jakobovou chorobou (CJD) a jeho množství porovnáno s mozky zdravých jedinců [78]. Bylo zjištěno, že modifikované aminokyselinové zbytky se nacházejí výlučně na N-konci proteinu a ačkoli např. lidský prionový protein obsahuje po odštěpení signální sekvence 21 argininových a lysinových zbytků, tak samotná glykace je velmi specifická a účastní se jí jen některé vhodné aminokyseliny. V případě lidského prionového proteinu se jedná o lysinové zbytky v pozicích 23, 24 a 27 a argininový zbytek 37 [79]. Díky těmto skutečnostem lze předpokládat, že glykace je posttranslační modifikace, jež by mohla ovlivňovat strukturu a tedy i samotnou funkci proteinů. Pokud by se tento předpoklad ukázal správným, mohl by být tento modifikační proces, a především jeho mechanismus, dále studován jako cíl terapie (např. inhibitory nebo stimulatory glykace) a to nejen v případě prionových onemocnění, ale i v případě dalších neurodegenerativních chorob [67].



Obrázek 2.6: Schéma popisující pravděpodobný mechanismus posttranslační neenzymatické modifikace proteinů spojených s neurodegenerativními chorobami, konkrétně proces glykace proteinů ve fázích oligomerizace a tvorby amyloidů a následnou aktivaci specifických receptorů RAGE, jejichž prostřednictvím dochází k poškozování buněk, převzato z [67]

Kapitola 3

Cíl práce

V předkládané diplomové práci bylo mým cílem připravit rekombinantní myší prionový protein a studovat jeho vlastnosti. Správné sbalení purifikovaného a renaturovaného proteinu bylo ověřeno pomocí CD spektroskopie. Takto připravený protein byl použit pro studium neenzymatické modifikace postranních aminokyselinových řetězců, konkrétně jejich volných aminoskupin, pomocí kyseliny glyoxalové.

Kapitola 4

Experimentální část

4.1 Materiál a přístroje

4.1.1 Použité chemikálie

agarosa	Bio-Rad (Hercules, USA)
akrylamid/bis-akrylamid	Bio-Rad (Hercules, USA)
amberlit	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
ampicilin	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
BCIP/NBT	Millipore (Watford, UK)
bromfenolová modř	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
Coomassie Brilliant Blue G250	Bio-Rad (Hercules, USA)
dihydrogenfosforečnan draselný	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
dihydrogenfosforečnan sodný	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
DMSO	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
Deep Vent DNA polymerasa	New England BioLabs (Ipswich, USA)
DNAsa II	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
dNTP's	Fermentas (Burlington, Kanada)
EDTA	Sigma (Buchs, Švýcarsko)

ethanol	Penta (Praha, ČR)
ethidium bromid	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
glutathion	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
glycerol	Penta (Praha, ČR)
glycin	Penta (Praha, ČR)
hydrogenfosforečnan sodný	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
hydroxid sodný	Penta (Praha, ČR)
chlorid draselný	Penta (Praha, ČR)
chlorid sodný	Penta (Praha, ČR)
IPTG	Roth (Karlsruhe, Německo)
isopropanol	Penta (Praha, ČR)
kyanoborohydrid sodný	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
kyselina boritá	Penta (Praha, ČR)
kyselina glyoxalová	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
kyselina chlorovodíková	Penta (Praha, ČR)
kyselina octová	Penta (Praha, ČR)
laurylsulfát sodný, n-dodecylsulfát sodný (SDS)	Bio-Rad (Hercules, USA)
LB-agarosa	Roth (Karlsruhe, Německo)
LB-médium	Roth (Karlsruhe, Německo)
lysosym	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
2-merkaptoethanol	Bio-Rad (Hercules, USA)
methanol	Penta (Praha, ČR)
močovina	Penta (Praha, ČR)
octan sodný	Penta (Praha, ČR)
peroxodisíran amonný	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
PMSF	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
proteinasa K	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
Rapid Ligation pufr	Fermentas (Burlington, Kanada)

restrikční endonukleasa <i>BamHI</i>	New England BioLabs (Ipswich, USA)
restrikční endonukleasa <i>NdeI</i>	Fermentas (Burlington, Kanada)
RNAsa A	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
sacharosa	Penta (Praha, ČR)
sušené mléko	Bio-Rad (Hercules, USA)
T4 DNA ligasa	Fermentas (Burlington, Kanada)
Tango pufr	Fermentas (Burlington, Kanada)
TEMED	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
ThermoPol pufr	New England BioLabs (Ipswich, USA)
Tris	Roth (Karlsruhe, Německo)
Triton X-100	Sigma (Buchs, Švýcarsko)
Tween 20	Sigma (Buchs, Švýcarsko)

4.1.2 Laboratorní přístroje

- termální cyklér Mastercycler Gradient, Eppendorf (Německo)
- horizontální agarosová elektroforéza Mini-Sub Cell GT System, Bio-Rad (USA)
- dokumentační systém MiniLumi, DNR Bio-Imaging Systems (Izrael)
- centrifugy: Centrifuge 5810 R, Eppendorf (Německo); MiniSpin plus, Eppendorf (Německo)
- inkubátor TCH 100, Laboratorní přístroje (ČR)
- inkubovaná třepačka NB-205, N-Biotek (Korea)
- sonikátor Sonic dismembrator, Dynatech (USA)
- pH metr inoLab Level 1, WTW (Německo)

- pH elektroda Single Pore Glass, Hamilton (Švýcarsko)
- UV-VIS spektrofotometr Biowave S2100, Biochrom (UK)
- vertikální polyakrylamidová elektroforéza Mini-PROTEAN, Bio-Rad (USA)
- blotovací zařízení Trans-Blot SD System, Bio-Rad (USA)
- termostaty: CH-100, Biosan (Litva); HB-2, Wealtec (Taiwan)

4.1.3 Ostatní použitý materiál

- chromatografická kolona Econo-Pac, Bio-Rad (USA)
- dialyzační membrána ZelluTrans, Roth (Německo)
- centrifugační filtry Amicon Ultra-4 a Ultra-0,5, Millipore (UK)
- nitrocelulosová membrána, Bio-Rad (USA)
- dialyzační nádoby Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units, Pierce (USA)
- souprava QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen (USA)
- souprava JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit, Genomed (Německo)

4.1.4 Bakteriální buňky, plazmidy, protilátky a afinitní matrice

- bakteriální buňky *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL, Novagen (USA)
- bakteriální buňky *Escherichia coli* DH5 α , Novagen (USA)
- plazmid pET-15b, Novagen (USA)
- myší monoklonální protilátka proti PrP^C: AH6, TSE Resource Centre (UK)

- myší monoklonální protilátka proti PrP^C: AG4, TSE Resource Centre (UK)
- myší monoklonální protilátka proti PrP^C AGE: EM31, Exbio (ČR)
- kozí polyklonální protilátka proti thrombinu: K-20, Santa Cruz Biotechnology (USA)
- oslí sekundární protilátky: DAM-AP, DAG-AP; Jackson ImmunoResearch (USA)
- afinitní matrice Ni-NTA Agarose, Qiagen (USA)
- afinitní matrice Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare (UK)

4.2 Metody

4.2.1 Konstrukce plazmidu pET-15b obsahující gen pro myší rekombinantní prionový protein (mrPrP)

- **Amplifikace DNA**

Ke konstrukci plazmidu obsahujícího příslušný gen pro mrPrP byly použity primery pET-up a pET-down a jako templátová DNA plazmid pMAL-c obsahující gen pro mrPrP (věnován T. Stopkou z ÚHKU).

Primery pro PCR reakci:

pET-up:

5 - CGCGGCAGCCATATGAAAAAGCGGCCAAAGCCTGGAGGGTGG - 3

pET-down:

5 - CGCGGATCCTCAGGATCTTCTCCCGTCGTAATAGGCCTGGGA - 3

Tabulka 4.1: PCR směs

voda	39,5 μ l
ThermoPol pufr	5 μ l
pET-up primer	0,5 μ l
pET-down primer	0,5 μ l
Deep Vent polymerasa	1 μ l
templátová DNA	1 μ l
5mM dNTP's	2,5 μ l

Pracovní cyklus:

1. 94°C/2 min
2. (95°C/1 min - 62°C/1 min - 72°C/1 min) 30x
3. 72°C/10 min - 4°C

- **Štěpení DNA restrikčními enzymy**

Poté bylo k 25 μ l PCR směsi přidáno 30 μ l TANGO pufru, 5 μ l směsi restrikčních enzymů *BamHI* a *NdeI* a doplněno vodou do 150 μ l. Směs byla ponechána v inkubátoru při 37°C po dobu tří hodin. Průběh reakce byl ověřen pomocí horizontální agarosové elektroforézy.

- **Izolace DNA z agarosového gelu**

Z agarosového gelu byl vyříznut skalpelem proužek obsahující požadovanou naštěpenou DNA, jež byla poté izolována pomocí soupravy QIAquick Gel Extraction Kit [80]. Vyříznutý proužek gelu byl zvážen a k DNA byly přidány tři objemy QG pufru. Tato směs byla inkubována 10 minut při 50°C, popř. lehce vortexována každé dvě minuty, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění agarosy. Poté byl přidán jeden objem isopropanolu a směs byla intenzivně promíchána. Minikolonka byla

umístěna do mikrozkuhavky a vzorek DNA byl aplikován do této minikolonky a odstředěn při 14000 g, 1 minutu, při laboratorní teplotě. Poté byl filtrát odstraněn a do minikolonky bylo přidáno 750 μ l PE pufru a roztok byl odstředěn při 14000 g, 1 minutu, při laboratorní teplotě. Zachycená DNA byla eluována z minikolonky 50 μ l sterilní vody odstředěním při 14000 g, 1 minutu, při laboratorní teplotě. Kvalita DNA byla ověřena pomocí horizontální agarosové elektroforézy (kap. 4.2.2).

- **Ligace insertní DNA do plazmidu pET-15b**

Izolovaná DNA byla zaligována do vektoru pET-15b předem naštěpeného restrikcčními endonukleasami *Bam*HI a *Nde*I.

Tabulka 4.2: Reakční směs

DNA	6 μ l
pET15b	1 μ l
Rapid Ligation pufr	2 μ l
T4 DNA ligasa	1 μ l

Reakce probíhala 30 minut při laboratorní teplotě.

4.2.2 Horizontální agarosová elektroforéza

Roztoky:

TBE pufr (koncentrovaný 10x): 108 g Tris-HCl, 55 g H₃BO₃, 14,8 g EDTA, doplněno vodou na 1 l, pH 8,0

vzorkový pufr: 40 % (w/v) sacharosa, 0,1 % (w/v) bromfenolová modř

K přípravě 1 % agarosového gelu bylo smícháno 0,5 g agarosy s 50 ml TBE pufru (koncentrovaný 1x), baňka byla zvážena a vzniklá suspenze byla zahřívána 1 minutu v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění. Po ochlazení na teplotu 60°C byly k roztoku

přidány 2 μl ethidium bromidu o koncentraci 4 mg/ml. Roztok byl nalit do sestavené formy s hřebenem, po ztuhnutí gelu (20 minut) byl vnitřní prostor naplněn TBE pufrem (koncentrovaným 1x) tak, aby hladina sahala 2 mm nad gel. Do jamek v gelu byly naneseny vzorky, předem smíchané se vzorkovým pufrem v poměru 2:1. Pracovní napětí bylo nastaveno na 71 V, elektroforéza probíhala 45 minut. Po skončení byl gel vizualizován a naskenován pomocí dokumentačního systému MiniLumi od firmy DNR Bio-Imaging Systems.

4.2.3 Transformace

K 50 μl kompetentních buněk *E. coli* (laboratorní kmen DH5 α) bylo přidáno 5 μl DNA po PCR (ligační směsi) a směs byla ponechána 10 minut na ledu. Mikrozkumavka se směsí byla inkubována při 42°C po dobu 42 sekund a poté přenesena na 1 minutu zpět na led (tzv. "tepelný šok"). Ke směsi bylo přidáno 200 μl sterilního LB-média bez antibiotika a mikrozkumavka byla dána na 1 hodinu do inkubátoru při 37°C. Poté byla směs nanášena na misky s agarem, který obsahuje ampicilin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Misky byly ponechány přes noc při teplotě 37°C.

4.2.4 Minipreparace plazmidové DNA ("miniprep")

Bylo vybráno několik kolonií, narostlých po transformaci plazmidovou DNA, a jimi bylo zaočkováno 5 ml sterilního LB-média obsahujícího ampicilin o koncentraci 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Bakterie rostly při 37°C přes noc při třepání v inkubované třepačce rychlostí 250 rpm a byly zcentrifugovány při 3200 g 10 minut při 4°C. K izolaci DNA byl použit JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit [81]. Po centrifugaci byl důkladně odstraněn supernatant a peleta byla rozsuspendována ve 250 μl roztoku G1. Vzniklá suspenze byla přenesena do mikrozkumavky a bylo k ní přidáno 250 μl roztoku G2, směs byla opatrně promíchána (nevortexována) a ponechána 5 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 350 μl roztoku G3, směs byla promíchána a odstředěna při 14000 g,

10 minut, při laboratorní teplotě. Supernatant byl přenesen do minikolonky a odstředěn při 14000 g, 1 minutu, při laboratorní teplotě, filtrát byl poté odstraněn. Do minikolonky bylo přidáno 500 μ l G4 pufru a roztok byl odstředěn při 14000 g, 1 minutu, při laboratorní teplotě, filtrát byl odstraněn a retenát v minikolonce byl znovu odstředěn při 14000 g, 1 minutu, při laboratorní teplotě. Zachycená DNA byla eluována z minikolonky 35 μ l 10 mM Tris-HCl pufru (pH 8,0), předeřátého na 100°C, odstředěním při 14000 g, 2 minuty, při laboratorní teplotě. Kvalita DNA byla ověřena pomocí horizontální agarosové elektroforézy (kap. 4.2.2) a poté osekvenována v laboratoři ÚDMP 1. LF UK.

4.2.5 Exprese mrPrP v bakteriích *E.coli*

K tomuto typu exprese byl použit kmen *E.coli* BL21(DE3)RIL. Ten ve svém genomu obsahuje gen pro T7 RNA polymerasu pod kontrolou *lac* promotoru. Přídavek IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) tak indukuje tvorbu T7 RNA polymerasy, která následně zajistí transkripci genu pro mrPrP, který se nalézá v plazmidu pET-15b pod kontrolou T7 promotoru.

30 μ l kompetentních buněk *E.coli* BL21(DE3)RIL bylo transformováno 2 μ l plazmidové DNA po minipreparaci (kap. 4.2.4). Vybranými koloniemi bylo zaočkováno 10 ml (1 ml média zaočkováno 1 kolonií) sterilního LB-média obsahujícího ampicilin o výsledné koncentraci 100 μ g/ml. Bakterie rostly při 37°C přes noc při třepání v inkubované třepačce při 250 otáček/min. Touto bakteriální suspenzí bylo zaočkováno 2x500 ml sterilního LB-média obsahujícího 100 μ g/ml ampicilin. Baňky byly následně třepány v inkubované třepačce rychlostí 250 rpm a teplotě 37 °C. Během třepání byl sledován růst bakterií v médiu měřením optické hustoty při 595 nm (OD_{595}). Při hodnotě OD 0,6-0,9 (asi 4 hodiny) byla provedena indukce exprese proteinu přídavkem 5 ml 100 mM IPTG na baňku (na výslednou koncentraci 1 mM). Po indukci byly bakterie kultivovány 3 hodiny při 250 rpm a teplotě 37 °C (nebo přes noc při 25 °C). Bakterie byly rozděleny

po 50 ml a sklizeny centrifugací při 3200 g, 10 minut, za teploty 4°C.

4.2.6 Příprava močovinového extraktu mrPrP

Roztoky:

pufr I: PBS, 20 % sacharosa

pufr II: PBS, 25 % (w/v) sacharosa, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 mM PMSF,
5 mM 2-merkaptoethanol

ekvilibrační pufr pro afinitní chromatografii: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl,
8 M urea, 5 mM 2-merkaptoethanol; pH 8,0

Bakterie produkují požadovaný protein v denaturovaném stavu ve formě inkluzních tělísek. Bakteriální pelety byly zamrazeny a rozmrazeny. Poté byly pelety rozsuspensdovány v 2,5 ml pufru I na jednu peletu, ponechány 10 minut na ledu a zcentrifugovány při 3200 g, 5 minut, 4°C. Následně byly pelety rozsuspensdovány v 1 ml PBS s 1 mM PMSF na jednu peletu a jednotlivé suspenze spojeny do jedné zkumavky. Vzniklý viskózní roztok byl sonikován 3 x 30 sekund za chlazení. K roztoku byla přidána 2 mg/ml DNasa I na výslednou koncentraci 5 µg/ml a poté byl roztok ponechán na ledu 1 hodinu za občasného míchání. Suspenze byla zcentrifugována při 18500 g, 30 minut, 4°C. Membrány byly odmyty 1 ml pufru II a poté byla peleta rozsuspensdována v 6 ml pufru II, ponechána 10 minut na ledě a zcentrifugována při 18500 g, 30 minut, 4°C. Tento postup byl ještě jednou opakován. Peleta byla zvážena a resuspensdována v 6 ml ekvilibračního pufru. V tomto pufru byla suspenze inkluzních tělísek ponechána přes noc inkubovat při laboratorní teplotě. Poté byla suspenze zcentrifugována při 18500 g, 1 hodinu, 4°C. Veškerá močovina použitá při tomto i při následujících pokusech byla přečištěna pomocí amberlitu (ionexová pryskyřice, 1 g / 100 ml močoviny).

4.2.7 Afinitní chromatografie na Ni-NTA matrici

Roztoky:

ekvilibrační pufr: 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 8 M urea,

5 mM 2-merkaptoethanol; pH 8,0

promývací pufr: 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 8 M urea,

5 mM 2-merkaptoethanol; pH 6,0

eluční pufr: 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 8 M urea,

5 mM 2-merkaptoethanol; pH 4,5

čistící pufr: 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 8 M urea; pH 4,0

Redukovaný protein byl purifikován vsádkovou chromatografií na afinitní Ni-NTA matrici. Do zkumavky bylo napipetováno 6 ml rozsuspendované afinitní matrice a toto množství bylo zcentrifugováno při 700 g, 2 minuty, 20°C. Supernatant byl odstraněn a matrice resuspendována v desetinásobném objemu ekvilibračního pufru. Poté byla suspenze zcentrifugována při 700 g, 2 minuty, 20°C a supernatant byl odstraněn. Promytí ekvilibračním pufrem bylo znovu zopakováno. K promyté matrici byl přidán redukovaný vzorek proteinu a zkumavka byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla suspenze zcentrifugována při 600 g, 5 minut, 20°C. Supernatant byl odstraněn a matrice byla promyta desetinásobným množstvím ekvilibračního pufru a inkubována 20 minut při laboratorní teplotě. Promytí bylo znovu opakováno s promývacím pufrem a inkubační dobou 10 minut. Po druhé centrifugaci byl odstraněn supernatant, k matrici byl přidán jeden objem promývacího pufru a celé množství bylo přeneseno na kolonu. Po ustálení matrice na dně kolony byl eluován protein 25 ml elučního pufru. Eluované frakce byly sbírány do mikrozkuvek po 1 ml objemu a poté uskladněny v lednici. Matrice na koloně byla přechištěna desetinásobným objemem čistícího pufru, destilované vody, rozsuspendována v 5 ml 20 % ethanolu a uskladněna v lednici k dalšímu použití.

4.2.8 Oxidace a renaturace mrPrP

Roztoky:

oxidační pufr: 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 8 M urea; pH 8,0

renaturační pufr: 100 mM NaH_2PO_4 ; pH 7,0

Jednotlivé frakce redukováného mrPrP byly spojeny a dialyzovány proti 1 l oxidačního pufru přes noc při 4°C. U zdialyzovaného vzorku bylo proměřeno celé spektrum v ultrafialové oblasti a spočtena koncentrace proteinu. Roztok proteinu byl naředěn oxidačním pufrem na přibližnou koncentraci 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a po přidání oxidovaného glutathionu (GSSG) o výsledné koncentraci 1 mM třepán přes noc v inkubované třepačce při 150 rpm a teplotě 25 °C. Takto oxidovaný protein byl dialyzován proti 2 l renaturačního pufru přes noc při 4°C. Průběh oxidace byl monitorován pomocí HPLC, tento experiment byl proveden J. Šebestíkem z ÚOCHB AV ČR.

4.2.9 Enzymatické odštěpení 6xHis-kotvy

K renaturovanému proteinu byl přidán 1 μl lidského thrombinu (1000 U/ml) na 1 ml vzorku (výsledná koncentrace 1 U/ml), směs byla lehce promíchána a inkubována 2 hodiny při 37°C. Poté byl vzorek zcentrifugován při 20000 g, 15 minut, 4°C a supernatant připraven pro další purifikační krok.

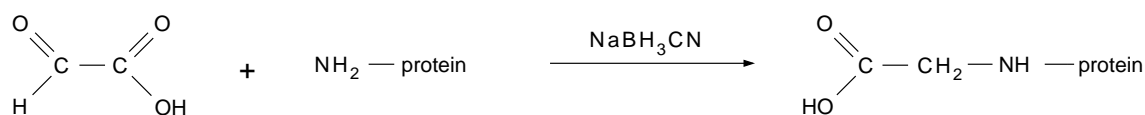
4.2.10 Afinity chromatografie na benzamidinové matrici

Renaturovaný protein s odštěpenou 6xHis-kotvou byl purifikován vsádkovou chromatografií na afinitní benzamidinové matrici. Do zkumavky bylo napipetováno 100 μl rozsuspendované afinitní matrice na 1 ml vzorku proteinu a toto množství bylo zcentrifugováno při 700 g, 2 minuty, 4°C. Supernatant byl odstraněn a matrice resuspendována v desetinásobném objemu renaturačního pufru. Poté byla suspenze zcentrifugována při 700 g, 2 minuty, 4°C a supernatant byl odstraněn. Promytí renaturačním pufrem bylo

znovu zopakováno. K ekvilibrované matrici byl přidán vzorek proteinu a zkumavka byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla suspenze zcentrifugována při 600 g, 5 minut, 4°C. Supernatant byl opatrně odsán a poté přefiltrován přes 0,22 μm filtr a uchován v lednici. Použitá matrice byla přečištěna 50 mM acetátovým pufrém (pH 5,0) a v tomto pufru s 20 % ethanolem uskladněna k opětovnému použití.

4.2.11 Neenzymatická modifikace mrPrP

Renaturovaný protein po afinitní chromatografii na benzamidinové matrici byl ultrafiltrován a tím zbaven odštěpené 6xHis-kotvy. Takto přečištěný mrPrP byl modifikován kyselinou glyoxalovou a to ve vzorcích obsahujících kyselinu glyoxalovou o koncentraci 0; 0,5; 5; 50 mM. K roztoku proteinu byla nejprve přidána 1 M kyselina glyoxalová rozpuštěná v renaturačním pufru a následně bylo upraveno pH zpět na hodnotu 7,0 pomocí 5 M NaOH. Poté byl přidán 1 M roztok kyanoborohydridu sodného v DMSO na výslednou koncentraci 1 mM. Modifikace (rovnice reakce na obr. 4.1) probíhala přes noc a směs byla ponechána na kývačce při 4°C. Takto zmodifikovaný protein byl zcentrifugován při 14000 g, 15 minut, 4°C a poté byly jak supernatanty, tak pelety analyzovány pomocí SDS-PAGE a western blotu.



Obrázek 4.1: Rovnice reakce kyseliny glyoxalové s koncovou aminoskupinou proteinu

4.2.12 Štěpení mrPrP pomocí proteinasy K

Správně sbalený, přečištěný a ultrafiltrováný protein byl podroben štěpení proteinasou K, a to v koncentracích 0; 0,5; 5; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinasy K v renaturačním pufru. Štěpení probíhalo 30 minut při 37 °C a poté bylo ukončeno přidáním 50 mM PMSF v DMSO na

finální koncentraci 1 mM. Vzorky štěpeného proteinu byly analyzovány pomocí western blotu.

4.2.13 SDS-PAGE (elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu)

Roztoky:

vzorkový pufr (koncentrovaný 5x): 0,312 M Tris-HCl, 50 % glycerol, 5 % SDS, 0,025 % bromfenolová modř; pH 6,8

pufr A: 1,875 M Tris, 0,5 % SDS; pH 8,8

pufr B: 0,625 M Tris, 0,5 % SDS; pH 6,8

elektrodový pufr: 25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,8

Tabulka 4.3: Příprava polyakrylamidových gelů (rozpis pro přípravu dvou gelů)

složení	12 % separační gel	5 % zaostřovací gel
destilovaná voda	4,9 ml	2,633 ml
pufr A	2 ml (pH 8,8)	-
pufr B	-	0,823 ml (pH 6,8)
40 % akrylamid/bis směs	3 ml	0,5 ml
TEMED	5 μ l	5 μ l
10 % (w/v) APS	100 μ l	40 μ l

Analýza proteinového složení vzorků byla prováděna pomocí SDS-PAGE v denaturujícím polyakrylamidovém gelu na přístroji Mini-PROTEAN (Bio-Rad) pro vertikální polyakrylamidovou elektroforézu. Byl připraven 12 % separační gel a 5 % zaostřovací gel (tab. 4.3). Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 5:1 a 5 minut povařeny na vodní lázni. Elektroforéza probíhala při napětí 100 V přibližně 90 minut. Pro stanovení velikosti proteinů byl použit marker PageRuler Prestained Protein Ladder od

firmy Fermentas. Rozdělené proteiny byly obarveny roztokem Coomassie Brilliant Blue G-250 od firmy Bio-Rad. Obarvené gely byly následně naskenovány a denzitometricky analyzovány pomocí dokumentačního systému MiniLumi a softwaru GelQuant Analysis Software od firmy DNR Bio-Imaging Systems, který umožňuje velmi přesnou denzitometrickou analýzu automatickou detekcí jednotlivých proužků ("bandů") na elektroforeogramu [82]. Pomocí tohoto programu byla stanovena i čistota proteinu.

Složení roztoku Coomassie Brilliant Blue G-250 od firmy Bio-Rad:

50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 450 ml 96 % ethanolu,

100 ml 99,8 % kyseliny octové, 450 ml destilované vody

Složení odbarvovacího roztoku:

350 ml 96 % ethanolu, 100 ml 99,8 % kyseliny octové, 550 ml destilované vody

4.2.14 Western blot (elektroforetický přenos proteinů na membránu s imunochemickou detekcí)

Roztoky:

anodový pufr: 25 mM Tris, 192 mM glycín, 10 % methanol; pH 8,3

katodový pufr: 25 mM Tris, 192 mM glycín; pH 8,3

TBS: 2,4 g Tris, 8,5 g NaCl, doplnit destilovanou vodou do 1 l

TBS-T: 2,4 g Tris, 8,5 g NaCl, 250 μ l Tween 20, doplnit destilovanou vodou do 1 l

Elektroforetický přenos proteinů na membránu byl proveden pomocí přístroje Trans-Blot SD System (Bio-Rad). Na anodu bylo naneseno 6 filtračních papírů namočených v anodovém pufru a papíry byly uhlazeny válečkem. Poté byla na papíry umístěna nitrocelulosaová membrána namočená v anodovém pufru a polyakrylamidový gel s rozdělenými proteiny namočený v katodovém pufru. Na gel byla položena vrstva šesti filtračních papírů namočených v katodovém pufru a vše bylo uhlazeno válečkem. Blotování probíhalo 1 hodinu při konstantním proudu 0,1 A na 1 gel. Membrána byla promývána 15 minut

v TBS-T, 15 minut v TBS-T s 5 % sušeným mlékem a poté zatavena do fólie s 2,5 ml TBS-T s 1 % sušeným mlékem a primárními protilátkami v příslušném poměru. Takto byla membrána inkubována přes noc při 4°C. Následující den byla membrána promyta 4 x 5 minut v TBS-T a 1 x 5 minut v TBS-T s 5 % sušeným mlékem a poté zatavena do fólie s 2,5 ml TBS-T s 1 % sušeným mlékem a sekundární protilátkou s konjugovanou alkalickou fosfatázou v příslušném poměru. Takto byla membrána inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byla membrána promyta 4 x 5 minut v TBS a zatavena do fólie s 1 ml substrátu BCIP/NBT. Postupné obarvování membrány bylo kontrolováno vizuálně. Po vyvolání byla membrána opláchnuta v TBS, usušena ve vertikální poloze a naskenována pomocí dokumentačního systému MiniLumi od firmy DNR Bio-Imaging Systems.

4.2.15 Spektrální analýza

- **Stanovení koncentrace proteinů proměřením UV spektra**

Koncentrace proteinů byla stanovena proměřením UV spektra roztoku proteinu v příslušném pufru v kyvetě o délce 1 cm. Jako slepý vzorek byl použit čistý pufr, ve kterém byl protein rozpuštěn. Pro stanovení koncentrace byla použita absorbance A při vlnové délce 280 nm a z této hodnoty byla spočtena koncentrace podle Lambert-Beerova zákona:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l,$$

kde ϵ je molární extinkční koeficient, c je koncentrace a l je optická dráha.

- **Měření spekter cirkulárního dichroismu**

CD spektra v daleké UV-oblasti byla měřena na spektropolarimetru Jasco 815 (Japonsko). Měření byla prováděna při laboratorní teplotě v renaturačním pufru (100 mM NaH₂PO₄) o různém pH (pH = 5,0 - 8,0). Spektra v oblasti 190 až 300 nm byla získána průměrem ze dvou počítačem kontrolovaných měření s kro-

kem 0.1 nm, rychlostí záznamu 10 nm/min a časovou konstantou 8 sekund. Optická délka použité křemenné kyvety byla 0,1 cm. Spektrum je vyjádřeno jako závislost molární elipticity na vlnové délce přepočtené na molární koncentraci zprůměrovaného aminokyselinového zbytku. Koncentrace proteinu byla 50 $\mu\text{g/ml}$. Tato měření byla provedena L. Bednárovou z ÚOCHB AV ČR.

Kapitola 5

Výsledky

5.1 Konstrukce plazmidu pET-15b obsahující gen pro myší rekombinantní prionový protein (mrPrP)

Kódující DNA byla namnožena metodou PCR (kap. 4.2.1). Jako templát byl použit plazmid pMAL-c obsahující příslušný gen pro myší prionový protein Prnpa 23-231.

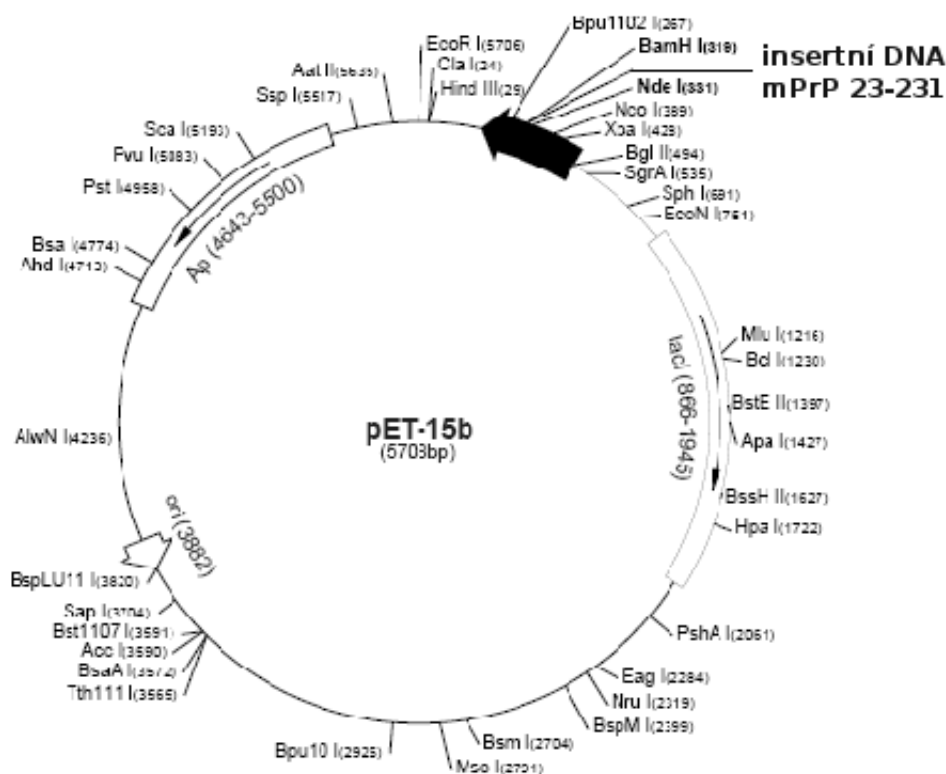
Reakční směs po PCR byla naštěpena restrikčními endonukleasami *NdeI* a *BamHI* a produkt byl rozdělen pomocí horizontální agarosové elektroforézy (kap. 4.2.2) v 1,0 % agarosovém gelu. Část gelu obsahující DNA kódující mrPrP (fragment o délce přibližně 630 bps) byl skalpelem vyříznut a DNA byla z gelu izolována pomocí výše zmíněné soupravy (kap. 4.2.1).

Ligace (kap. 4.2.1) probíhala 30 minut při laboratorní teplotě. Touto ligační směsí byly transformovány bakteriální buňky *E.coli* DH5 α (kap. 4.2.3). Ze čtyř kolonií byla provedena minipreparace plazmidové DNA (kap. 4.2.4). K potvrzení přítomnosti inzertní DNA kódující mrPrP v plazmidu pET-15b (obr. 5.1, str. 50) bylo provedeno štěpení restrikčními endonukleasami *BamHI* a *NdeI* (obr. 5.2, str. 51). Takto byl

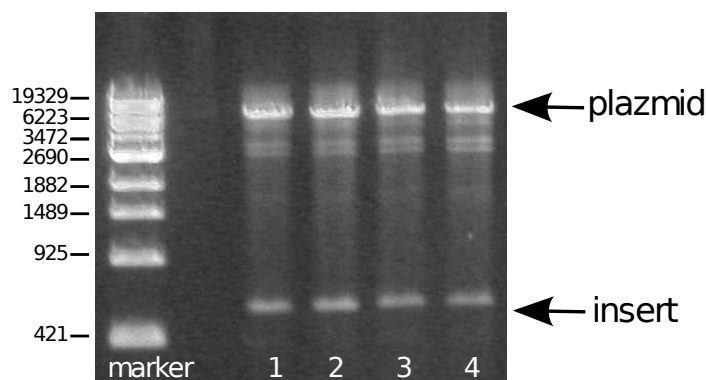
vyštěpen úsek DNA o velikosti přibližně 630 bps, což odpovídá velikosti genu *Prnpa*. Výsledek štěpení byl ověřen pomocí horizontální agarosové elektroforézy (kap. 4.2.2).

Vybrané klony (3 a 4), obsahující DNA kódující mrPrP v plazmidu pET-15b, byly osekvenovány v oblasti kódující daný fúzní protein (obr. 5.3, str. 51). K sekvenaci byla použita souprava BigDye Terminator v3.1 Sequencing kit od firmy Applied Biosystems (USA) a vzorky byly analyzovány pomocí kapilárního sekvenátoru ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) v laboratoři ÚDMP 1. LF UK.

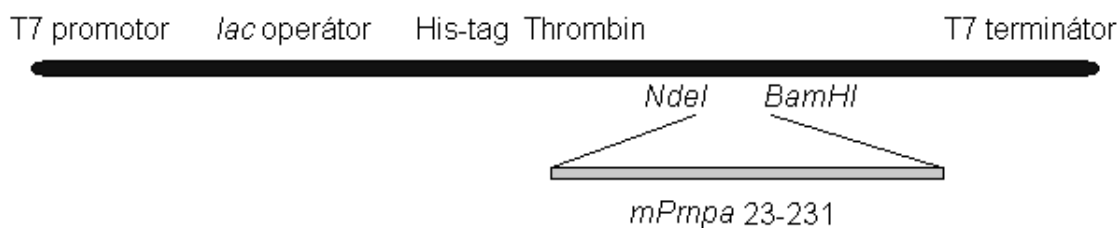
Pro expresi proteinu byl vybrán jeden klon – klon 4. Podle sekvenace vykazoval tento klon 100 % shodu s předlohou.



Obrázek 5.1: Plazmid pET-15b s vyznačeným místem inserce DNA kódující mrPrP 23-231



Obrázek 5.2: Kontrola ligace DNA kódující mrPrP do plazmidu pET-15b pomocí restričních endonukleas *BamHI* a *NdeI*, dráha marker: λ DNA/Eco13I (StyI) marker, dráha 1, 2, 3, 4: jednotlivé klony plazmidové DNA po minipreparaci štěpené pomocí restričních endonukleas *BamHI* a *NdeI*)



Obrázek 5.3: Úsek plazmidové DNA kódující fúzní protein mrPrP 23-231 s 6xHis-kotvou (označenou jako His-tag, štěpné místo pro thrombin označené jako Thrombin) s vyznačeným T7 promotorem a terminátorem a s vyznačeným *lac* operátorem

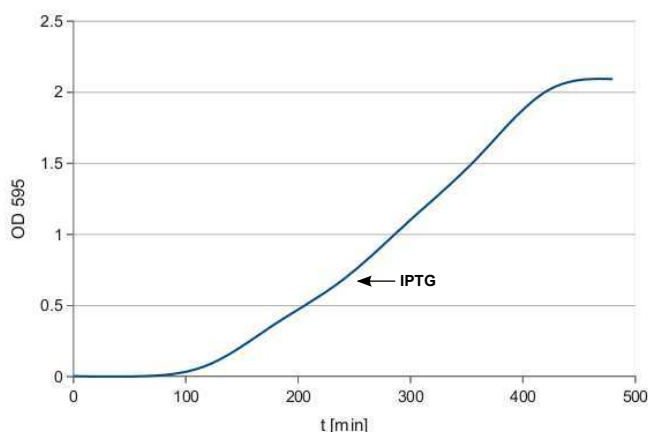
5.2 Příprava myšího rekombinantního prionového proteinu (mrPrP)

Rekombinantní prionový protein lze připravit expresí v kompetentních bakteriích *E. coli* BL21(DE3)RIL. Cílem mého projektu bylo připravit mrPrP v takovém množství a

čistotě, aby mohla být provedena spektrální analýza, jež by ověřila účinnost purifikace a renaturace proteinu.

5.2.1 Exprese mrPrP v bakteriích *E.coli*

Kompetentní buňky *E.coli* BL21(DE3)RIL byly transformovány plazmidem pET-15b obsahujícím úsek kódující mrPrP 23-231. Narostlými koloniemi byla zaočkována LB-média v Erlenmeyerových baňkách obsahujících antibiotikum ampicilin a baňky byly třepány v inkubované třepačce při 37°C. Při OD₅₉₅ 0,65 byl přidán do média roztok IPTG na konečnou koncentraci 1 mM (růstová křivka na obr. 5.4).



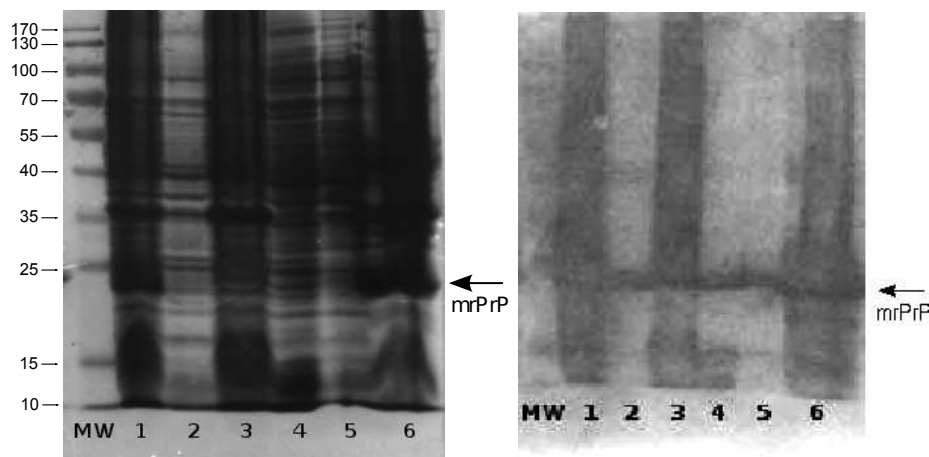
Obrázek 5.4: Růstová křivka exprese mrPrP v buňkách *E.coli* BL21(DE3)RIL, indukce pomocí IPTG byla provedena při OD₅₉₅ = 0,65

Po indukci byly bakterie kultivovány 4 hodiny a poté umístěny přes noc do chladové místnosti.

5.2.2 Příprava močovinového extraktu mrPrP

Po expresi mrPrP v buňkách *E.coli* BL21(DE3)RIL a následné centrifugaci 1 litru bakteriální suspenze bylo získáno 16,2 g mokré biomasy. Z bakteriálních buněk byly

izolovány inkluzní tělíska, jež byly následně promývány pufrem s obsahem sacharosy, detergentu a redukčního činidla (kap. 4.2.6). Hmotnost inkluzí po izolaci byla 1,2 g. (elektroforeogram a western blot na obr. 5.5)

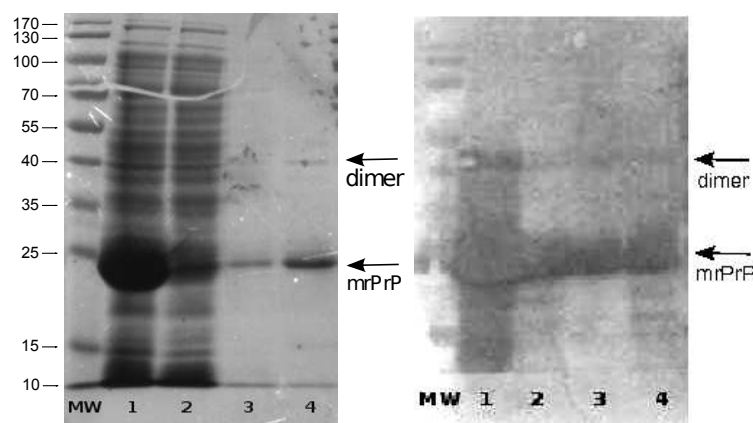


Obrázek 5.5: SDS elektroforeogram (vlevo) a western blot (vpravo, obarvený primárními protilátkami AG4 v poměru 1:4000 a AH6 v poměru 1:2000 a sekundární protilátkou DAM AP v poměru 1:8000) zachycující promývání inkluzních tělísek mrPrP, jednotlivé dráhy znázorňují: MW - SDS marker molekulových hmotností; 1 - buněčná suspenze po indukci IPTG; 2 - buněčný supernatant; 3 - suspenze inkluzních tělísek v pufru A; 4 - supernatant po 1. promytí pufrem II; 5 - supernatant po 2. promytí pufrem II; 6 - izolovaná inkluzní tělíska

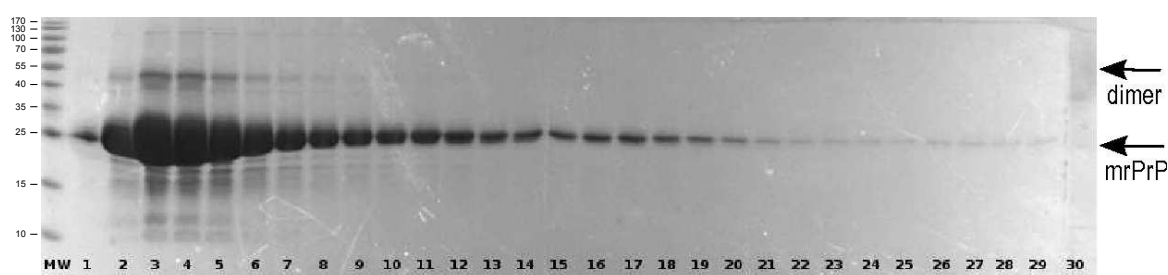
5.2.3 Afinitní chromatografie na Ni-NTA matrici

Izolovaná inkluzní tělíska byla rozpuštěna v 8 M močovíně s přídavkem 5 mM 2-merkaptoethanolu pro dosažení úplné redukce proteinu. Nerozpuštěné proteiny byly odstraněny centrifugací a supernatant byl dále purifikován pomocí vsádkové afinitní chromatografie s použitím afinitní matrice Ni-NTA Agarose od firmy Qiagen, předem ekvilibrované na pH 8,0 (kap. 4.2.7). Po nanesení supernatantu byla afinitní matrice dvakrát promyta a zachycený protein byl eluován krokovým snížením pH až na hodnotu 4,5. Výsledných třicet frakcí včetně původního supernatantu (před nanesením a

po inkubaci s afinitní matricí) a jednotlivých promytí bylo poté analyzováno pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.13) a western blotu (kap. 4.2.14) znázorněné na obr. 5.6 a obr. 5.7.



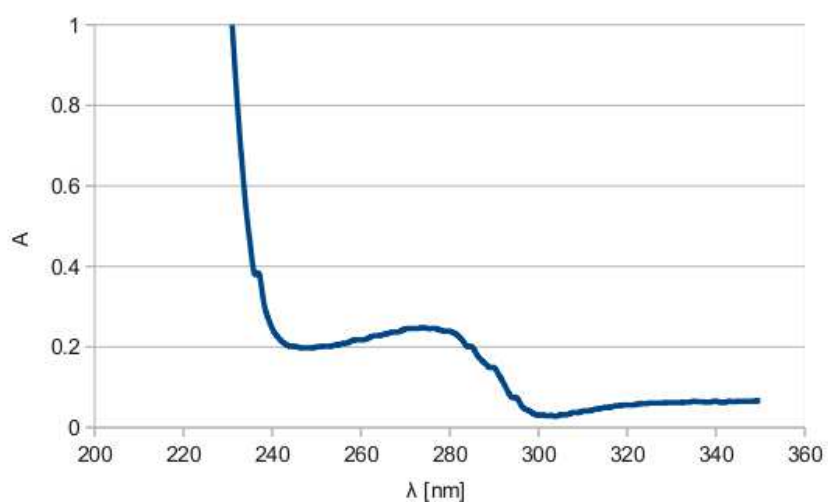
Obrázek 5.6: SDS elektroforeogram (vlevo) a western blot (vpravo, obarvený primárními protilátkami AG4 v poměru 1:4000 a AH6 v poměru 1:2000 a sekundární protilátkou DAM AP v poměru 1:8000) zachycující supernatant obsahující mrPrP před nanesením a po inkubaci s afinitní matricí a jednotlivá promytí afinitní matrice, jednotlivé dráhy znázorňují: MW - SDS marker molekulových hmotností; 1 - supernatant před nanesením na afinitní matrici; 2 - supernatant po nanesení na afinitní matrici; 3 - supernatant po 1. promytí; 4 - supernatant po 2. promytí



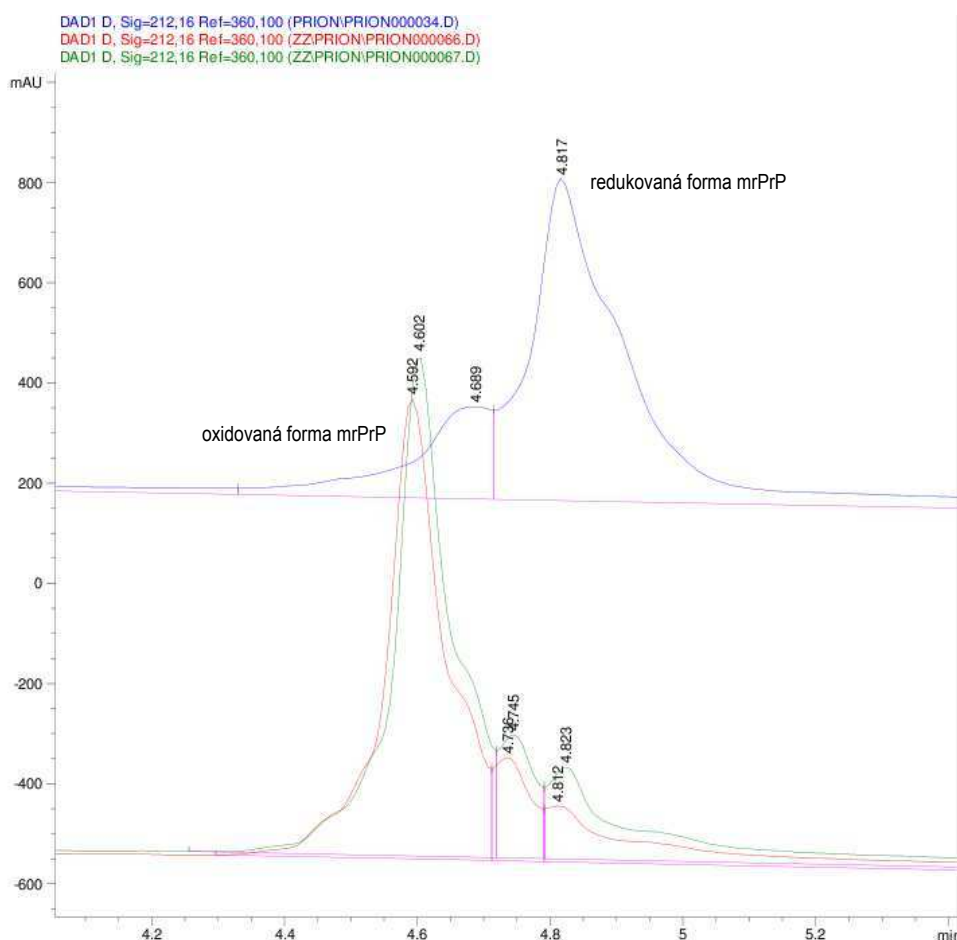
Obrázek 5.7: SDS elektroforeogram znázorňující průběh afinitní chromatografie mrPrP na Ni-NTA matrici, jednotlivé dráhy znázorňují: 1 - SDS marker molekulových hmotností; 1-30 - frakce

5.2.4 Oxidace a renaturace mrPrP

Eluované frakce 2 až 30 byly spojeny a dialyzovány proti oxidačnímu pufru pro úplné odstranění 2-merkaptoethanolu. V tomto pufru při pH 8,0 byl redukovaný protein naředěn na koncentraci 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (koncentrace proteinu v 8 M močovíně byla stanovena proměřením UV spektra, viz. kap. 4.2.15 a 5.3.1, spektrum znázorněno na obr. 5.8) a oxidován pomocí oxidovaného glutathionu (GSSG) o výsledné koncentraci 1 mM (kap. 4.2.8). Průběh oxidace byl monitorován pomocí HPLC (znázorněno na obr. 5.9, str. 56) a pomocí SDS-PGE (kap. 4.2.13) a western blotu (kap. 4.2.14) (znázorněno na obr. 5.10, str. 57 a obr. 5.11, str. 58).



Obrázek 5.8: Absorpční spektrum spojených frakcí mrPrP po redukcí a po oddialyzování 2-merkaptoethanolu

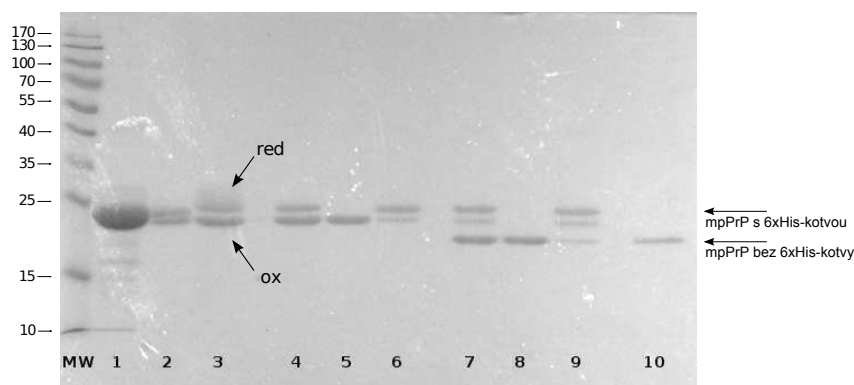


Obrázek 5.9: Průběh vymývání redukované a oxidované formy mrPrP z HPLC kolony (frakce byly vymývány gradientem acetonitrilu od 5 - 55 % při 70°C), jednotlivé formy mrPrP jsou označeny a barevně odlišeny (modře je znázorněna redukovaná forma, červeně a zeleně je znázorněna oxidovaná forma)

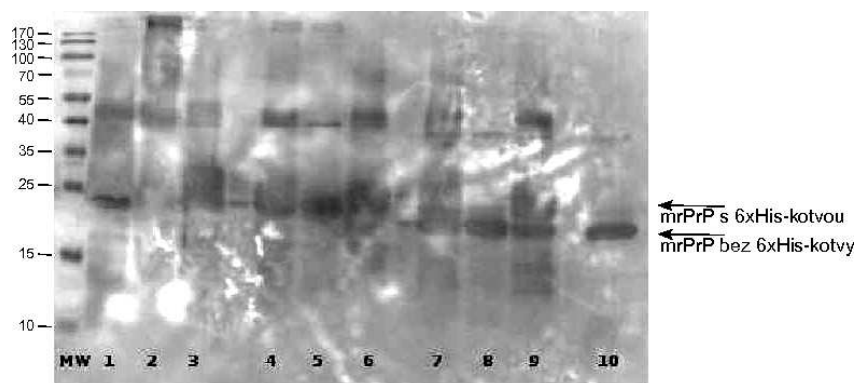
5.2.5 Enzymatické odštěpení 6xHis-kotvy

Renaturovaný mrPrP byl vystaven působení proteolytického enzymu thrombinu (1000 U/ml) o výsledné koncentraci 1 U/ml (kap. 5.2.5). Odštěpená 6xHis-kotva byla v závěru purifikace (po afinitní chromatografii na benzamidinové matrici) odstraněna ultrafiltrací pomocí filtrů Amicon Ultra od firmy Millipore (UK). Průběh enzymatického odštěpení

6xHis-kotvy byl monitorován pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.13) a western blotu (kap. 4.2.14) (znázorněno na obr. 5.10, str. 57 a obr. 5.11, str. 58).



Obrázek 5.10: SDS elektroforeogram zachycující průběh oxidace a renaturace mrPrP, enzymatického odštěpení 6xHis-kotvy a afinitní chromatografie na benzamidinové matrici, jednotlivé dráhy znázorňují: MW - SDS marker molekulových hmotností; 1 - spojené frakce 2 až 30 po afinitní chromatografii na Ni-NTA matrici; 2 - redukovaný mrPrP v 8 M močovíně; 3 - oxidovaný mrPrP v 8 M močovíně; 4 - renaturovaný mrPrP s 6xHis-kotvou, necentrifugovaný vzorek; 5 - renaturovaný mrPrP s 6xHis-kotvou, supernatant; 6 - renaturovaný mrPrP s 6xHis-kotvou, peleta; 7 - renaturovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy, necentrifugovaný vzorek; 8 - renaturovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy, supernatant; 9 - renaturovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy, peleta; 10 - renaturovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy po afinitní chromatografii na benzamidinové matrici

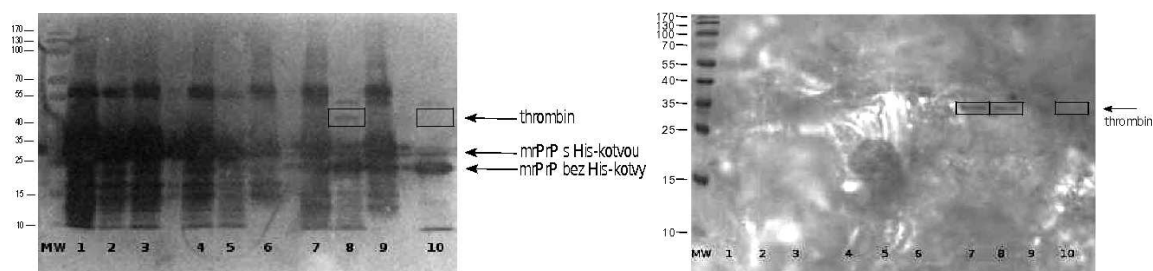


Obrázek 5.11: Western blot (obarvený primárními protilátkami AG4 v poměru 1:4000 a AH6 v poměru 1:2000 a sekundární protilátkou DAM AP v poměru 1:8000) zachycující průběh oxidace a renaturace mrPrP, enzymatického odštěpení 6xHis-kotvy a afinitní chromatografie na benzamidinové matrici, jednotlivé dráhy znázorňují: MW - SDS marker molekulových hmotností; 1 - spojené frakce 2 až 30 po afinitní chromatografii na Ni-NTA matrici; 2 - redukovaný mrPrP v 8 M močovíně; 3 - oxidovaný mrPrP v 8 M močovíně; 4 - renaturovaný mrPrP s 6xHis-kotvou, necentrifugovaný vzorek; 5 - renaturovaný mrPrP s 6xHis-kotvou, supernatant; 6 - renaturovaný mrPrP s 6xHis-kotvou, peleta; 7 - renaturovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy, necentrifugovaný vzorek; 8 - renaturovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy, supernatant; 9 - renaturovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy, peleta; 10 - renaturovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy po afinitní chromatografii na benzamidinové matrici

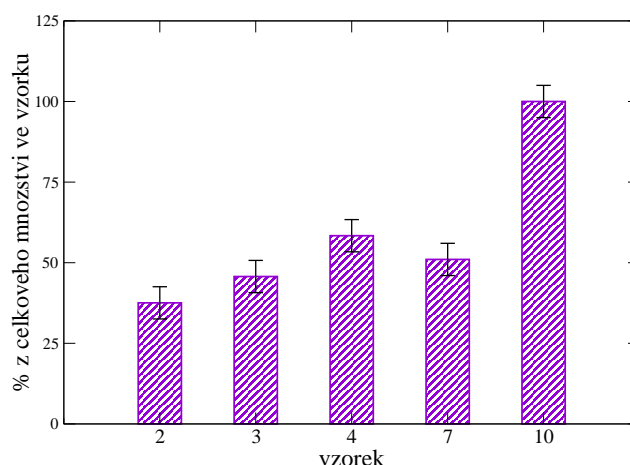
5.2.6 Afinitní chromatografie na benzamidinové matrici

Renaturovaný mrPrP s odštěpenou 6xHis-kotvou byl centrifugován při 20000 g, 15 minut, 4°C a supernatant byl dále purifikován pomocí vsádkové afinitní chromatografie s použitím afinitní matrice Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow od firmy GE Healthcare, předem ekvilibrované na pH 7,0 (kap. 4.2.10). Po nanesení supernatantu byla afinitní matrice inkubována 30 minut při laboratorní teplotě a po navázání thrombinu zcentrifugována při 700 rpm, 5 minut, 4°C. Supernatant byl přefiltrován přes 0,22 μ m filtr a po následné ultrafiltraci byl plně purifikovaný mrPrP připraven pro analýzu. Celý průběh

purifikace, včetně odstranění thrombinu po odštěpení 6xHis-kotvy (obr. 5.12), byl monitorován pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.13) a western blotu (kap. 4.2.14) (znázorněno na obr. 5.10, str. 57 a obr. 5.11, str. 58). Graf s denzitometricky určenými hodnotami (znázorněno na obr. 5.13, str. 60) ukazuje vzrůstající čistotu proteinu během purifikace (hodnoty vyjádřeny v procentech celkového množství proteinu ve vzorku).



Obrázek 5.12: Western blot (vlevo, obarvený primárními protilátkami AG4 v poměru 1:4000 a AH6 v poměru 1:2000 a sekundární protilátkou DAM AP v poměru 1:8000) a western blot (vpravo, obarvený primární protilátkou K-20 specifickou vůči thrombinu v poměru 1:100 a sekundární protilátkou DAG AP v poměru 1:8000) zachycující průběh oxidace a renaturace mrPrP, enzymatického odštěpení 6xHis-kotvy a afinitní chromatografie na benzamidinové matici, jednotlivé dráhy znázorňují: MW - SDS marker molekulových hmotností; 1 - spojené frakce 2 až 30 po afinitní chromatografii na Ni-NTA matici; 2 - redukovaný mrPrP v 8 M močovíně; 3 - oxidovaný mrPrP v 8 M močovíně; 4 - renaturovaný mrPrP s 6xHis-kotvou, necentrifugovaný vzorek; 5 - renaturovaný mrPrP s 6xHis-kotvou, supernatant; 6 - renaturovaný mrPrP s 6xHis-kotvou, peleta; 7 - renaturovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy, necentrifugovaný vzorek; 8 - renaturovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy, supernatant; 9 - renaturovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy, peleta; 10 - renaturovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy po afinitní chromatografii na benzamidinové matici



Obrázek 5.13: Graf znázorňující množství požadované formy mrPrP během redukce, oxidace a renaturace mrPrP, enzymatického odštěpení 6xHis-kotvy a afinitní chromatografie na benzamidinové matrici vyjádřené v procentech celkového množství proteinu ve vzorku, hodnoty v grafu jsou určeny denzitometricky, vzorky (číslování se shoduje s obr. 5.10, str. 57): 2 - redukovaný mrPrP v 8 M močovíně; 3 - oxidovaný mrPrP v 8 M močovíně; 4 - renaturovaný mrPrP s 6xHis-kotvou, necentrifugovaný vzorek; 7 - renaturovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy, necentrifugovaný vzorek; 10 - renaturovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy po afinitní chromatografii na benzamidinové matrici

5.3 Spektrální analýza myšího rekombinantního proteinu (mrPrP)

Renaturovaný a purifikovaný protein byl v konečné fázi analyzován pomocí spektrálních metod: UV spektrofotometrie a CD spektroskopie.

5.3.1 Stanovení koncentrace proteinů proměřením UV spektra

Koncentrace proteinu byla spočtena z naměřené hodnoty absorbance pomocí Lambert-Beerova zákona (kap. 4.2.15). Aby mohla být koncentrace vyjádřena v jednotkách

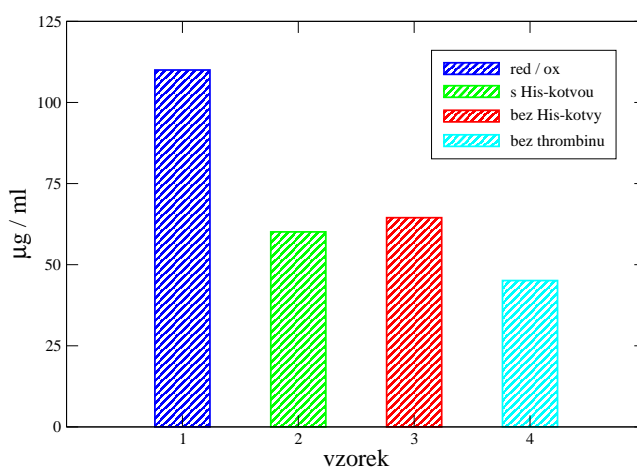
mg/ml, byla vynásobena hodnotou M podle vztahu odvozeného z Lambert-Beerova zákona:

$$c [\text{mg/ml}] = \frac{A}{l \epsilon_{\lambda}} \cdot M [\text{g/mol}]$$

kde ϵ_{λ} je molární extinkční koeficient, c je koncentrace, l je optická dráha a M je molární hmotnost.

Pro tyto výpočty byla použita hodnota molárního extinkčního koeficientu při 280 nm $62400 \text{ dm}^3/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ a to jak pro mrPrP s 6xHis-kotvou, tak pro mrPrP bez 6xHis-kotvy. Další hodnotou nutnou pro výpočet koncentrace proteinu byla molární hmotnost, jež se rovná 25458 g/mol pro mrPrP s 6xHis-kotvou a 23576 g/mol pro mrPrP bez 6xHis-kotvy.

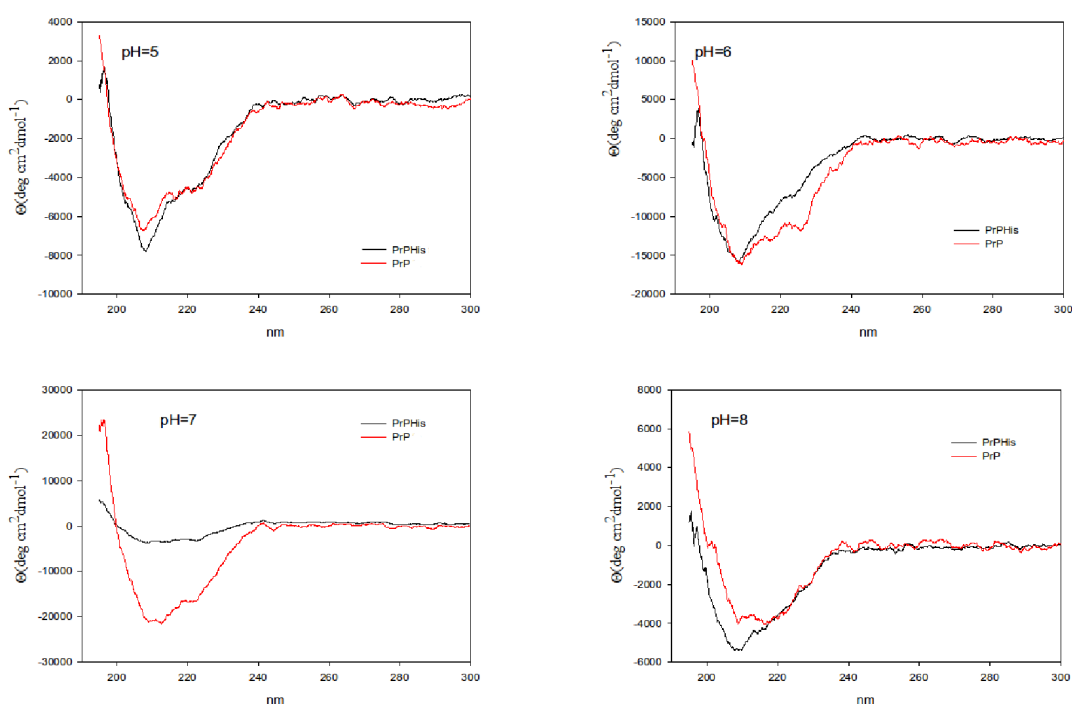
Koncentrace mrPrP v $\mu\text{g/ml}$ v jednotlivých krocích purifikace vystihuje graf na obr. 5.14. Konečný výtěžek čistého správně sbaleného proteinu bez 6xHis-kotvy byl 4 mg/ml (z 1 litru buněčné kultury).



Obrázek 5.14: Graf znázorňující množství mrPrP v $\mu\text{g/ml}$ během oxidace a renaturace mrPrP (vzorek 1), enzymatického odštěpení 6xHis-kotvy (vzorky 2 a 3) a afinitní chromatografie na benzamidinové matici (vzorek 4)

5.3.2 CD spektroskopie

Správný obsah α -helikální sekundární struktury renaturovaného a plně purifikovaného mrPrP s 6xHis-kotvou i bez 6xHis-kotvy byl ověřen pomocí metody měření cirkulárního dichroismu (CD). Spektra obou forem proteinu o koncentraci $50 \mu\text{g/ml}$ v renaturačním pufru ($100 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$) při pH 5,0; pH 6,0; pH 7,0 a pH 8,0 (obr. 5.15) byla měřena na spektropolarimetru Jasco 815 (Japonsko) při laboratorní teplotě (kap. 4.2.15). Tato měření byla provedena L. Bednárovou z ÚOCHB AV ČR.



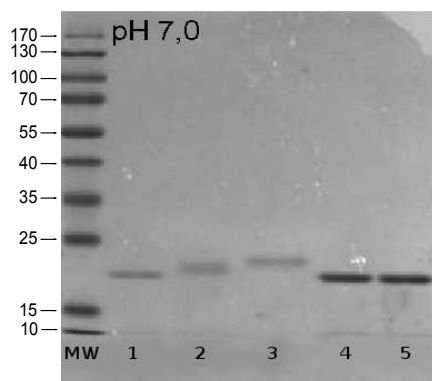
Obrázek 5.15: CD spektra mrPrP 23-231 měřené v daleké UV-oblasti při pH 5,0 až 8,0, spektra jsou pro jednotlivé formy proteinu barevně odlišena (černá-s 6xHis-kotvou, červená-bez 6xHis-kotvy)

Podle těchto měření bylo zřejmé, že mrPrP s odštěpenou 6xHis-kotvou (na rozdíl od proteinu s 6xHis-kotvou) vykazuje správný obsah α -helikální sekundární struktury, avšak pouze při pH 6,0 a 7,0.

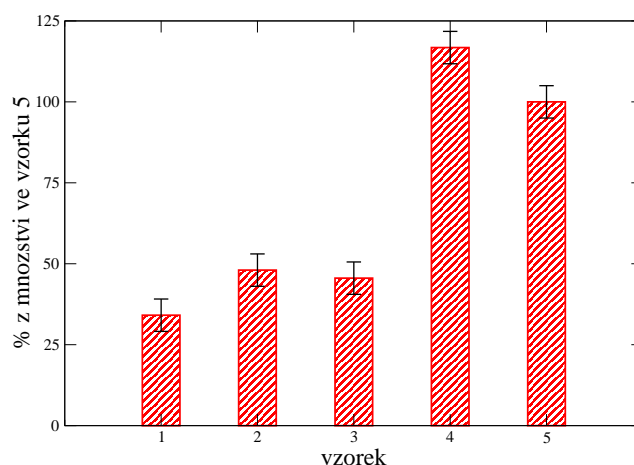
5.4 Neenzymatická modifikace myšího rekombinantního proteinu (mrPrP)

5.4.1 Neenzymatická modifikace mrPrP kyselinou glyoxalovou

Renaturovaný a purifikovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy byl neenzymaticky modifikován kyselinou glyoxalovou (GA) o výsledných koncentracích 0,5; 5; 50 mM v renaturačním pufru při pH 7,0 (kap. 4.2.11). Modifikace probíhala přes noc při teplotě 4°C. Stejným způsobem byly inkubovány i kontrolní vzorky mrPrP bez 6xHis-kotvy, a to jak pouze s 1 mM NaBH₃CN, tak i v čistém pufru. Modifikované i nemodifikované vzorky byly zcentrifugovány při 18200 g, 15 minut, 4°C a poté byly supernatanty, pelety i nezcentrifugované vzorky analyzovány pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.13), western blotu (kap. 4.2.14) a denzitometrie (znázorněno na obr. 5.16; obr. 5.18, str. 65 a obr. 5.17, str. 64).

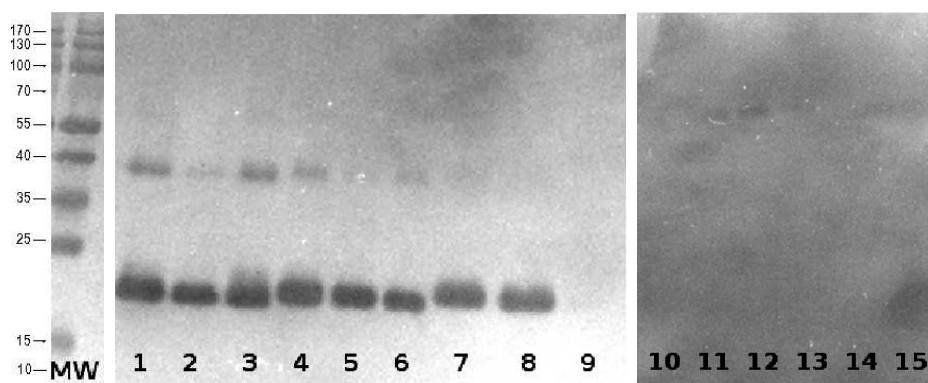


Obrázek 5.16: SDS elektroforeogram zachycující průběh neenzymatické modifikace mrPrP kyselinou glyoxalovou při pH 7,0, jednotlivé dráhy znázorňují: MW - SDS marker molekulových hmotností; 1 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 0,5 mM GA; 2 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 5 mM GA; 3 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 50 mM GA; 4 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy s 1 mM NaBH₃CN; 5 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy;



Obrázek 5.17: Graf znázorňující množství mrPrP během neenzymatické modifikace mrPrP kyselinou glyoxalovou (GA) při pH 7,0 vyjádřené v procentech počátečního množství proteinu (vzorek 12. mrPrP s 6xHis-kotvou) určených pomocí denzitometrie, jednotlivé sloupce znázorňují: 1 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 0,5 mM GA; 2 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 5 mM GA; 3 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 50 mM GA; 4 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy s 1 mM NaBH₃CN; 5 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy

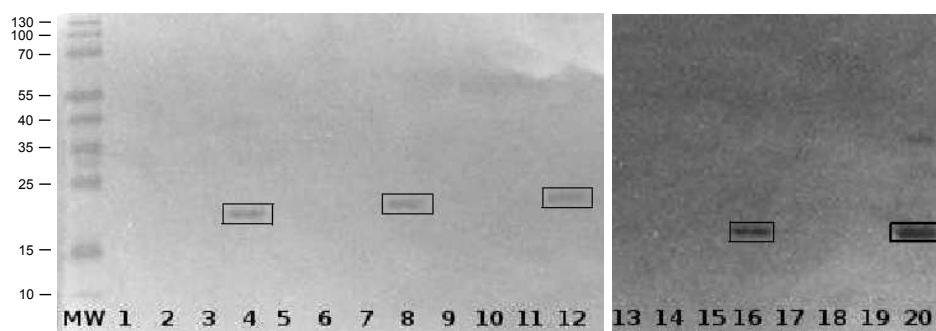
Díky modifikaci došlo ke zvýšení molekulové hmotnosti mrPrP v závislosti na koncentraci kyseliny glyoxalové (obr. 5.16, str. 63). Během této reakce však dochází k úbytku proteinu vlivem nespecifické agregace, což je patrné na obr. 5.17. Pomocí specifické protilátky proti modifikovanému prionovému proteinu EM31 bylo možné sledovat vzrůstající stabilitu modifikovaného proteinu v závislosti na zvyšující se koncentraci kyseliny glyoxalové (obr. 5.18, str. 65).



Obrázek 5.18: Western blot (obarvený primární protilátkou EM31 v poměru 1:2000 a sekundární protilátkou DAM AP v poměru 1:8000) zachycující průběh neenzymatické modifikace mrPrP kyselinou glyoxalovou při pH 7,0, obarvený monoklonální protilátkou EM31 (1:2000), specifickou vůči modifikovanému proteinu, jednotlivé dráhy znázorňují: MW - SDS marker molekulových hmotností; 1 - necentrifugovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 0,5 mM GA; 2 - mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 0,5 mM GA, supernatant; 3 - mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 0,5 mM GA, peleta; 4 - necentrifugovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 5 mM GA; 5 - mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 5 mM GA, supernatant; 6 - mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 5 mM GA, peleta; 7 - necentrifugovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 50 mM GA; 8 - mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 50 mM GA, supernatant; 9 - mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 50 mM GA, peleta; 10 - necentrifugovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy s 1 mM NaBH₃CN; 11 - mrPrP bez 6xHis-kotvy s 1 mM NaBH₃CN, supernatant; 12 - mrPrP bez 6xHis-kotvy s 1 mM NaBH₃CN, peleta; 13 - necentrifugovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy; 14 - necentrifugovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy, supernatant; 15 - necentrifugovaný mrPrP bez 6xHis-kotvy, peleta

5.4.2 Štěpení mrPrP pomocí proteinasy K

Po neenzymatické modifikaci kyselinou glyoxalovou (GA) byly všechny modifikované i kontrolní vzorky štěpeny proteinasou K (PK) o výsledných koncentracích 0; 0,5; 5; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ v renaturačním pufru při pH 7,0 (kap. 4.2.12). Vzorky rozštěpeného proteinu byly analyzovány pomocí western blotu (kap. 4.2.14) (znázorněno na obr. 5.19, str. 66), na kterém bylo možné vidět, že modifikovaný protein byl stejně jako nemodifikovaný plně štěpen již při nejnižší koncentraci proteinasy K.



Obrázek 5.19: Western blot (obarvený primárními protilátkami AG4 (1:4000) a AH6 (1:2000) a sekundární protilátkou DAM AP v poměru 1:8000) zachycující průběh štěpení proteinasou K, jednotlivé dráhy znázorňují: MW - SDS marker molekulových hmotností; 1 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 0,5 mM GA, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ PK; 2 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 0,5 mM GA, 5 $\mu\text{g/ml}$ PK; 3 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 0,5 mM GA, 50 $\mu\text{g/ml}$ PK; 4 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 0,5 mM GA, 0 $\mu\text{g/ml}$ PK; 5 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 5 mM GA, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ PK; 6 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 5 mM GA, 5 $\mu\text{g/ml}$ PK; 7 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 5 mM GA, 50 $\mu\text{g/ml}$ PK; 8 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 5 mM GA, 0 $\mu\text{g/ml}$ PK; 9 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 50 mM GA, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ PK; 10 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 50 mM GA, 5 $\mu\text{g/ml}$ PK; 11 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 50 mM GA, 50 $\mu\text{g/ml}$ PK; 12 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy po modifikaci 50 mM GA, 0 $\mu\text{g/ml}$ PK; 13 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy s 1 mM NaBH_3CN , 0,5 $\mu\text{g/ml}$ PK; 14 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy s 1 mM NaBH_3CN , 5 $\mu\text{g/ml}$ PK; 15 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy s 1 mM NaBH_3CN , 50 $\mu\text{g/ml}$ PK; 16 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy s 1 mM NaBH_3CN , 0 $\mu\text{g/ml}$ PK; 17 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ PK; 18 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy, 5 $\mu\text{g/ml}$ PK; 19 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy, 50 $\mu\text{g/ml}$ PK; 20 - rozpustný mrPrP bez 6xHis-kotvy, 0 $\mu\text{g/ml}$ PK

Kapitola 6

Diskuse

Podařilo se nám připravit myší rekombinantní prionový protein (mrPrP 23-231) exprimovaný v buňkách *E.coli* BL21(DE3)RIL v podobě inkluzních tělísek, optimalizovat proces purifikace a renaturace proteinu použitím dvou typů afinitní chromatografie a získat tak dostatečné množství čistého proteinu bez 6xHis-kotvy. Abychom ověřili, zda je protein správně sbalený a vykazuje správný obsah α -helikální sekundární struktury (36%) publikovaný pro buněčný prionový protein (PrP^C) [83], použili jsme metodu měření spekter cirkulárního dichroismu (CD spektroskopie).

- **Příprava myšího rekombinantního prionového proteinu (mrPrP)**

Exprimovaný protein v podobě inkluzních tělísek byl nejprve rozpuštěn v pufru s 8 M močovinou a poté purifikován na afinitní matici Ni-NTA Agarose. Důkladné odstranění 2-merkaptoethanolu a zároveň převedení proteinu do pufru, jež má pH 8,0 a obsahuje opět 8 M močovinu, bylo velmi důležité pro efektivní průběh reakce s oxidovaným glutathionem, protože oxidace probíhá v denaturujícím prostředí pouze při tomto zásaditém pH. Průběh oxidace mohl být sledován pomocí SDS-PAGE (obr. 5.10, str. 57 a obr. 5.11, str. 58) vzhledem k faktu, že redukováná a oxidovaná forma mrPrP vykazují zdánlivě různou molekulovou hmotnost, tedy přesněji různou elektroforetickou pohyblivost. Tento efekt je pravděpodobně

způsoben tím, že oxidovaná forma zaujímá při vytvoření disulfidické vazby kompaktnější uspořádání a jeví se tedy jako menší v porovnání s redukovanou formou proteinu. Tento názor potvrzují i výsledky získané metodou HPLC (obr. 5.9, str. 56), kde bylo možné sledovat rozdílné vymývání obou forem proteinu z kolony v závislosti na jejich prostorovém uspořádání. Samotná oxidace ovšem nikdy neproběhne úplně, není tedy oxidován veškerý protein. Vysvětlit to můžeme tak, že vzhledem k nutnosti odstranění 2-merkptoethanolu před samotnou oxidací musí být redukovaný protein dialyzován a během tohoto procesu dochází k částečné nespecifické oxidaci proteinu. Takto modifikovaný protein nemůže již být oxidován glutathionem a během renaturace dochází k jeho agregaci. Této nespecifické oxidaci se dá předejit naředěním proteinu na koncentraci přibližně 100 $\mu\text{g/ml}$. Následně byl protein renaturován dialýzou do pufru (100 mM NaH_2PO_4) o pH 5,0; 6,0; 7,0 a 8,0 a pomocí thrombinu, jenž vykazuje i v takto širokém rozmezí pH přijatelnou aktivitu, byla 6xHis-kotva odštěpena. Po štěpení bylo nutné thrombin odstranit a toho bylo dosaženo pomocí druhé afinitní chromatografie na afinitní matici Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow. Účinnost tohoto kroku byla ověřena pomocí western blotu, jenž byl obarven kozí polyklonální protilátkou K-20 (specifickou proti thrombinu) (obr. 5.11, str. 60). Průběh celého procesu purifikace a renaturace proteinu popisuje graf znázorňující množství požadované formy mrPrP vyjádřené v procentech celkového množství proteinu ve vzorku při jednotlivých krocích (obr. 5.13, str. 60). Hodnoty v tomto grafu byly určeny pomocí denzitometrie a vidíme na nich narůstající čistotu proteinu v procentech. Podle těchto výsledků může být určena čistota výsledného mrPrP bez 6xHis-kotvy jako $> 95\%$ (vzhledem k experimentální chybě). Další graf (obr. 5.14, str. 61) ukazuje koncentrace proteinu v $\mu\text{g/ml}$ spočtené z hodnot absorbance při 280 nm. Celkový výtěžek čistého mrPrP bez 6xHis-kotvy po odstranění thrombinu (spočtený z hodnot v grafu na obr. 5.14, str. 61) je 4 mg v 80 ml vzorku.

- **CD spektroskopie**

Z úvodních měření CD spekter bylo zřejmé, že mrPrP s 6xHis-kotvou nevykazuje správný obsah α -helikální sekundární struktury publikovaný pro PrP^C (36%) [83]. Stejně tak bylo jasné, že i pH pufru, ve kterém je protein renaturován, má vliv na správné sbalení proteinu. Proto byla samotná renaturace a posléze i měření CD spekter provedeno při čtyřech hodnotách pH s proteinem s 6xHis-kotvou i bez 6xHis-kotvy. Z naměřených spekter bylo vidět, že při pH 6,0 a pH 7,0 mrPrP bez 6xHis-kotvy vykazuje správnou strukturu a je tedy vhodně sbalen (obr. 5.15, str. 62). Pro jednoduché přiblížení lze říci, že PrP^C, a tedy i rozpustný rekombinantní prionový protein s převažujícím množstvím α -helixů, se při měření CD spekter projeví jako křivka s dvojitým minimem při 208 a 222 nm a se zápornou hodnotou molární elipticity 15 000-20 000 deg.cm²/dmol [84]. Tato měření ale nejsou příliš přesná a slouží pouze jako přibližné ověření struktury správně sbaleného proteinu porovnáním s již publikovanými výsledky.

- **Neenzymatická modifikace myšího rekombinantního proteinu (mrPrP)**

Pro studium neenzymatické modifikace mrPrP kyselinou glyoxalovou bylo zvoleno pH 7,0 a to z důvodů přítomnosti NaBH₃CN, jenž se chová nestabilně už při slabě kyselém pH, avšak pro průběh modifikační reakce je nezbytný. Modifikace mrPrP bez 6xHis-kotvy byla provedena kyselinou glyoxalovou, a to ve třech různých koncentracích (0,5 mM, 5 mM, 50 mM), vždy s kyanoborohydridem sodným o výsledné koncentraci 1 mM. Reakce způsobí navázání kyseliny glyoxalové na koncovou aminoskupinu příslušné aminokyseliny (především lysinu nebo argininu) a dá vznik karboxymethylované aminoskupině v polypeptidovém řetězci proteinu. Podle počtu modifikovaných aminoskupin se takto zvýší i samotná molekulová hmotnost celého proteinu (vždy o hodnotu 58 g/mol na jednu modifikovanou aminoskupinu). To lze velice dobře vidět na výsledcích SDS-PAGE a western blotu (obr. 5.16, str. 63 a 5.18, str. 65), jenž byl obarven monoklonální protilátkou

EM31, která se specificky váže pouze na modifikovaný protein. Z výsledků denzitometrie (obr. 5.17, str. 64) je jasné, že při modifikaci dochází k úbytku proteinu v důsledku agregace. Na western blotu lze vidět přímo rozpustnou i nerozpustnou frakci proteinu modifikovaného třemi různými koncentracemi kyseliny glyoxalové a z těchto výsledků je možné usoudit, že za vzrůstající stabilitou rozpustného proteinu stojí zvyšující se koncentrace kyseliny glyoxalové. Je totiž zřejmé, že množství nerozpustné frakce, tedy pelety, klesá se zvyšující se koncentrací kyseliny glyoxalové v reakci neenzymatické modifikace, stejně jako množství dimerů mrPrP, viditelných na western blotu. Takto modifikovaný protein byl spolu s nemodifikovaným proteinem podroben reakci s proteinasou K. Tato reakce může sloužit do jisté míry jako ověření struktury prionového proteinu, neboť je známo, že PrP^C, tedy obecně rozpustný buněčný prionový protein, vykazuje vysokou citlivost vůči proteolýze. Pokud ale dojde k přechodu k méně rozpustným formám prionového proteinu, lze na western blotu vidět určitou rezistenci vůči štěpení proteinasou K. V našem případě (obr. 5.19, str. 66) nedošlo k žádným změnám v citlivosti proteinu vůči proteinase K, a to ani jak v případě modifikovaných, tak nemodifikovaných vzorků proteinu. Naše dosavadní výsledky jsou tedy v souladu s výsledky již publikovanými, které tvrdí, že samotná glykace je děj velmi specifický a účastní se ho pouze některé aminokyseliny na N-koncové části proteinu (viz. kap. 2.3.4). Je tedy pravděpodobné, že tato reakce ovlivňuje stabilitu celé molekuly, avšak vzhledem k lokalizaci modifikovatelných aminokyselin nemá vliv na citlivost proteinu vůči proteinase K (úsek rezistentní vůči proteolýze se nachází na C-konci proteinu). Další výzkum naší laboratoře se v budoucnu zaměří na přesnou identifikaci modifikovaných aminokyselin metodami hmotnostní spektroskopie a studium konformačních změn v molekule modifikovaného proteinu pomocí CD spektroskopie.

Kapitola 7

Závěr

- Na základě literárních údajů jsem zpracovala přehled výzkumu prionových onemocnění. Především jsem se zaměřila na studium prionové hypotézy a jejího definitivního prokázání. S tímto tématem úzce souvisí i výzkum soustředěný na hledání možných kofaktorů prionového proteinu důležitých při samotné konverzní reakci PrP^C na PrP^{Sc} .
- Připravila jsem rekombinantní myší prionový protein mrPrP 23-231 s 6xHis-kotvou i bez 6xHis-kotvy.
- Výtěžek čistého mrPrP 23-231 byl 4 mg z 1 litru buněčné kultury a jeho čistota byla $> 95\%$. Takto připravený protein byl analyzován pomocí CD spektroskopie, jež ověřila správné sbalení renaturovaného proteinu a objasnila nutnost odštěpení 6xHis-kotvy.
- Rekombinantní mrPrP 23-231 byl použit ke studiu neenzymatické modifikace proteinu kyselinou glyoxalovou a jejího vlivu na stabilitu modifikovaného proteinu.

Literatura

- [1] Cho H.J.: Nature, **262**, 411-412 (1976).
- [2] Alper T., Cramp W.A., Haig D.A., Clarke M.C.: Nature, **214**, 764-766 (1967).
- [3] Carp R.I., Ye X., Kascsak R.J., Rubenstein R.: Ann. N.Y. Acad. Sci., **724**, 221-234 (1994).
- [4] Kimberlin R.H.: Nature, **297**, 107-108 (1982).
- [5] Soto C.: *Prions, The New Biology of Proteins*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2006.
- [6] Griffith J.S.: Nature, **215**, 1043-1044 (1967).
- [7] Prusiner S.B.: Science, **216**, 136-144 (1982).
- [8] Cohen F.E., Prusiner S.B.: Annu. Rev. Biochem., **67**, 793-819 (1998).
- [9] Chesebro B.: Science, **279**, 42-43 (1998).
- [10] Prusiner S.B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 13363–13383 (1998).
- [11] Soto C., Castilla J.: Nature Med., **10**, S63–S67 (2004).
- [12] Kupfer I., Hinrichs W., Groschup M.H.: Curr. Mol. Med., **9**, 826-835 (2009).

- [13] Zahn R., Liu A., Luhrs T., Riek R., Von Schroetter C., Garcia F.L., Billeter M., Calzolari L., Wider G., Wuthrich K.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 145-150 (2000).
- [14] Knaus K.J., Morillas M., Swietnicki W., Malone M., Surewicz W.K., Yee V.C.: Nat. Struct. Biol., **8**, 770-774 (2001).
- [15] DeMarco M.L., Daggett V.: C. R. Biol., **328**, 847-862 (2005).
- [16] Govaerts C., Wille H., Prusiner S.B., Cohen F.E.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**, 8342-8347 (2004).
- [17] Ryou C.: J. Microbiol. Biotechn., **17**, 1059-1070 (2007).
- [18] Tuzi N.L., Gall E., Melton D., Manson J.C.: J. Gen. Virol., **83**, 705-711 (2002).
- [19] Peoc'h K., Volland H., De Gassart A., Beaudry P., Sazdovitch V., Sorgato M.C., Creminon C., Laplamche J.L., Lehmann S.: FEBS Lett., **536**, 61-65 (2003).
- [20] Premzl M., Sangiorgio L., Strumbo B., Marshall Graves J.A., Simoncic T., Gready J.E.: Gene, **314**, 89-102 (2003).
- [21] Lampo E., Van Poucke M., Hugot K., Hayes H., Van Zeveren A., Peelman L.J.: BMC Genomics, **8**, 138 (2007).
- [22] Watts J.C., Drisaldi B., Ng V., Yang J., Strome B., Horne P., Sy M.S., Yoong L., Young R., Mastrangelo P., Bergeron C., Fraser P.E., Carlson G.A., Mount H.T., Schmitt-Ulms G., Westaway D.: EMBO J., **17**, 4038-4050 (2007).
- [23] Prusiner S.B., Scott M.R., DeArmond S.J., Cohen F.E.: Cell, **93**, 337-348 (1998).
- [24] Jarrett J.T., Lansbury P.T.: Cell, **73**, 1055-1058 (1993).
- [25] Aguzzi A., Polymenidou M.: Cell, **2**, 313-327 (2004).

- [26] Telling G.C., Scott M., Mastrianni J., Gabizon R., Torchia M., Cohen F.E., DeArmond S.J., Prusiner S.B.: *Cell*, **83**, 79-90 (1995).
- [27] Baskakov I.V.: *J. Biol. Chem.*, **279**, 7671-7677 (2004).
- [28] Zahn R., Von Schroetter C., Wuthrich K.: *FEBS Lett.*, **417**, 400-404 (1997).
- [29] Mehlhorn I., Groth D., Stöckel J., Moffat B., Reilly D., Yansura D., Willett W.S., Baldwin M., Fletterick R., Cohen F.E., Vandlen R., Henner D., Prusiner S.B.: *Biochemistry*, **35**, 5528-5537 (1996).
- [30] Rezaei H., Marc D., Choiset Y., Takahashi M., Hoa G.H.B., Haertlé T., Grosclaude J., Debey P.: *Eur. J. Biochem.*, **267**, 2833-2839 (2000).
- [31] Hornemann S., Korth C., Oesch B., Riek R., Wider G., Wüthrich K., Glockshuber R.: *FEBS Lett.*, **413**, 277-281 (1997).
- [32] Jackson G.S., Hill A.F., Joseph C., Hosszu L., Power A., Waltho J.P., Clarke A.R., Collinge J.: *Biochym. Biophys. Acta*, **1431**, 1-13 (1999).
- [33] Yin S.M., Zheng Y., Tien P.: *Protein Expres. Purif.*, **32**, 104-109 (2003).
- [34] Prusiner S.B., Scott M., Foster D., Pan K.M., Groth D., Mirenda C., Torchia M., Yang S.L., Serban D., Carlson D.A., Hoppe P.C., Westway D., DeArmond S.J.: *Cell*, **63**, 673-686 (1990).
- [35] Race R.E., Fadness L.H., Chesebro B.: *J. Gen. Virol.*, **68**, 1391-1399 (1992).
- [36] Ryou C., Mays C.E.: *Int. J. Med. Sci.*, **5**, 347-353 (2008).
- [37] Raeber A.J., Botchelt D.R., Scott M., Prusiner S.B.: *J. Virol.*, **66**, 6155-6163 (1992).
- [38] Kocisko D.A., Come J.H., Priola S.A., Chesebro B., Raymond G.J., Lansbury P.T., Caughey B.: *Nature*, **370**, 471-474 (1994).

- [39] Caughey B., Kocisko D.A., Raymond G.J., Lansbury P.T.: *Chem. Biol.*, **2**, 807-817 (1995).
- [40] Horiuchi M., Priola S.A., Chabry J., Caughey B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5836-5841 (2000).
- [41] Raymond G.J., Bossers A., Raymond L.D., O'Rourke K.I., McHolland L.E., Bryant P.K., Miller M.W., Williams E.S., Smits M., Caughey B.: *EMBO J.*, **19**, 4425-4430 (2000).
- [42] Baron G.S., Wehrly K., Dorward D.W., Chesebro B., Caughey B.: *EMBO J.*, **21**, 1031-1040 (2002).
- [43] Callahan M.A., Xiong L., Caughey B.: *J. Biol. Chem.*, **276**, 28022-28028 (2001).
- [44] Caughey B., Raymond L.D., Raymond G.J., Maxson L., Silveira J., Baron G.S.: *J. Virol.*, **77**, 5499-5502 (2003).
- [45] Wong C., Xiong L., Horiuchi M., Raymond L., Wehrly K., Chesebro B., Caughey B.: *EMBO J.*, **20**, 377-386 (2001).
- [46] Hill A.F., Antoniou M., Collinge J.: *J. Gen. Virol.*, **80**, 11-14 (1999).
- [47] Saborio G.P., Soto C., Kascsak R.J., Levy E., Kascsak R., Harris D.A., Frangione B.: *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **258**, 470-475 (1999).
- [48] Saborio G.P., Permanne B., Soto C.: *Nature*, **411**, 810-813 (2001).
- [49] Castilla J., Saa P., Morales R., Abid K., Maundrell K., Soto C.: *Method. Enzymol.*, **412**, 3-21 (2006).
- [50] Castilla J., Saa P., Hetz C., Soto C.: *Cell*, **121**, 195/206 (2005).

- [51] Soto C., Anderes L., Suardi S., Cardone F., Castilla J., Frossard M., Peano S., Saa P., Limido L., Carbonatto M., Ironside J., Torres J., Pocchiari M., Tagliavini F.: FEBS Lett., **579**, 638-642 (2005).
- [52] Lucassen R., Nishina K., Supattapone S.: Biochemistry, **42**, 4127-4135 (2003).
- [53] Deleault N., Geoghegan J.C., Nishina K., Kascsak R., Williamson R.A., Supattapone S.: J. Biol. Chem., **280**, 26873-26879 (2005).
- [54] Orem N.R., Geoghegan J.C., Deleaut N.R., Kascsak R., Supattapone S.: J. Neurochem., **96**, 1409-1415 (2005).
- [55] Deleault N.R., Harris B.T., Rees J.R., Supattapone S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **104**, 9741-9746 (2007).
- [56] Atarashi R., Moore R.A., Sim V.I., Haugson A.G., Dorward D.W., Onwubiko W.A., Priola S.A., Caughey B.: Nat. Methods, **4**, 645-648 (2007).
- [57] Atarashi R., Wilham J.M., Christensen L., Hughson A.G., Moore R.A., Johnson L.M., Onwubiko W.A., Priola S.A., Caughey B.: Nat. Methods, **5**, 211-212 (2008).
- [58] Baskakov I.V., Legname G., Baldwin M.A., Prusiner S.B., Cohen F.E.: J. Biol. Chem., 21140-21148 (2002).
- [59] Bocharova O.V., Breydo L., Parfenov A.S., Salnikov V.v., Baskakov I.V.: J. Mol. Biol., **346**, 645-659 (2005).
- [60] Legname G., Baskakov I.V., Nguyen H.B., Riesner D., Cohen F.E., DeArmond S.J., Prusiner S.B.: Science, **305**, 673-676 (2004).
- [61] Legname G., Nguyen H.B., Baskakov I.V., Cohen F.E., DeArmond S.J., Prusiner S.B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102**, 2168-2173 (2005).

- [62] Westaway D., DeArmond S.J., Cayetano-Canlas J., Groth D., Foster D., Yang S.L., Torchia M., Carlson G.A., Prusiner S.B.: *Cell*, **76**, 117-129 (1994).
- [63] Makarava N., Kovacs G.G., Bocharova O., Savtchenko R., Alexeeva I., Budka H., Rohwer R.G., Baskakov I.V.: *Acta Neuropathol.*, **119**, 177-187 (2010).
- [64] Wang F., Wang X., Yuan C.G., Ma J.: *Science*, **327**, 1132-1135 (2010).
- [65] Kim J.-I., Cali I., Surewicz K., Kong Q., Raymond G.J., Atarashi R., Race B., Qing L., Gambetti P., Caughey B., Surewicz W.K.: *J. Biol. Chem.*, in press (2010).
- [66] Supattapone S.: *Science*, **327**, 1091-1092 (2010).
- [67] Miranda H.V., Outeiro T.F.: *J. Pathol.*, **221**, 13-25 (2010).
- [68] Maillard L.: *C. R. Hebd. Acad. Sci.*, **154**, 66-68 (1912).
- [69] Brownlee M., Vlassara H., Cerami A.: *Ann. Intern. Med.*, **101**, 527-537 (1984).
- [70] Acharya A.S., Manning J.M.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 1406-1412 (1980).
- [71] Eble A.S., Thorpe S.R., Baynes J.W.: *J. Biol. Chem.*, **258**, 9406-9412 (1983).
- [72] McPherson J.D., Shilton B.H., Walton D.J.: *Biochemistry*, **27**, 1901-1907 (1988).
- [73] Fu M.X., Requena J.R., Jenkins A.J., Lyons T.J., Baynes J.W., Thorpe S.R.: *J. Biol. Chem.*, **271**, 9982-9986 (1996).
- [74] Smith P.R., Thornalley P.J.: *Biochem. Int.*, **28**, 429-439 (1992).
- [75] Watkins N.G., Neglia-Fisher C.I., Dyer D.G., Thorpe S.R., Baynes J.W.: *J. Biol. Chem.*, **262**, 7207-7212 (1987).
- [76] Schleicher E., Wieland O.H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **884**, 199-205 (1986).
- [77] Schmidt A.M., Yan S.D., Yan S.F., Stern D.M.: *J. Clin. Invest.*, **108**, 949-955 (2001).

- [78] Sasaki N., Takeuchi M., Chowei H., Kikuchi S., Hayashi Y., Nakano N., Ikeda H., Yamagishi S., Kitamoto T., Saito T., Makita Z.: *Neurosci. Lett.*, **326**, 117-120 (2002).
- [79] Choi Y.G., Kim J.I., Jeon Y.C., Park S.J., Choi E.K., Rubenstein R., Kascsak R.J., Carp R.I., Kim Y.S.: *J. Biol. Chem.*, **279**, 30402-30409 (2004).
- [80] QIAquick Gel Extraction Kit, [10.4.2010], URL <http://www.qiagen.com>.
- [81] JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit, [10.4.2010], URL <http://www.genomed-dna.com>.
- [82] GelQuant Analysis Software, [10.4.2010], URL <http://www.dnr-is.com>.
- [83] Pan K.M., Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Huang Z., Fletterick R.J., Cohen F.E., Prusiner S.B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10962-10966 (1993).
- [84] Greenfield N.J., Fasman G.D.: *Biopolymers*, **7**, 595-610 (1969).

Seznam zkratek

AGEs	"advanced glycation end products"
BCIP/NBT	"5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium"
BSE	bovinní spongiformní encefalopatie
CD	cirkulární dichroismus
CJD	Creutzfeld-Jakobova choroba
CNS	centrální nervová soustava
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNAse	deoxyribonukleasa
dNTP's	deoxynukleotidtrifosfáty
Dpl	"doppel" protein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GPI	glykosylfosfatidylinositol
GSSG	oxidovaný glutathion
HPLC	"high pressure liquid chromatography"
IIM 1stFM CU	"Institute of Immunology and Microbiology, 1st Faculty of Medicine, Charles University"
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
LB	Luria-Bertani
mrPrP	myší rekombinantní prionový protein

NF- $\kappa\beta$	"nuclear factor- $\kappa\beta$ "
Ni-NTA	"nickel-nitrilotriacetic acid"
OD	optická hustota
PBS	"phosphate buffered saline"
PCR	polymerázová řetězová reakce
PK	proteinasa K
PMCA	"protein misfolding cyclic amplification"
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl-fosfatidylglycerol
Prnd	gen kódující Dpl
Prpn	gen kódující PrP
PrP	prionový protein
PrP27-30	rezistentní fragment prionového proteinu po štěpení proteinasou K
PrP ^C	buněčný prionový protein
PrP-res	rezistentní prionový protein
PrP ^{Sc}	"scrapie" prionový protein
QUIC	"quaking-induced" konverzní esej
RAGE	receptor pro AGEs
RNA	ribonukleová kyselina
RNAse	ribonukleasa
rpm	počet otáček za minutu
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS
Sho	"shadoo" protein
Srpn	gen kódující Sho
TBE	"Tris/Borate/EDTA "
TBS	"Tris buffered saline"
TBS-T	"Tris buffered saline-Tween"

TEMED	tetramethylethyldiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSE	transmisní spongiformní encefalopatie
ÚDMP 1. LF UK	Ústav dědičných metabolických poruch 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfúze
ÚIM 1. LF UK	Ústav imunologie a mikrobiologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy
ÚOCHB AV ČR	Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, v.v.i.
UV	ultrafialová oblast
vCJD	variantní Creutzfeld-Jakobova choroba

Třípísmenné a jednopísmenné zkratky aminokyselin

A	Ala	alanin	M	Met	methionin
C	Cys	cystein	N	Asn	asparagin
D	Asp	kyselina asparagová	P	Pro	prolin
E	Glu	kyselina glutamová	Q	Gln	glutamin
F	Phe	fenylalanin	R	Arg	arginin
G	Gly	glycin	S	Ser	serin
H	His	histidin	T	Thr	threonin
I	Ile	isoleucin	V	Val	valin
K	Lys	lysin	W	Trp	tryptofan
L	Leu	leucin	Y	Tyr	tyrosin

